



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2014**

**PAPEL DE EF-Tu EN LA INTERACCIÓN
DE *Pseudomonas aeruginosa* CON LOS
QUERATINOCITOS HUMANOS**

Inmaculada Martínez Ramos



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2014**

**Programa de doctorado en Microbiología Ambiental y
Biotecnología**

**PAPEL DE EF-Tu EN LA INTERACCIÓN
DE *Pseudomonas aeruginosa* CON LOS
QUERATINOCITOS HUMANOS**

Inmaculada Martínez Ramos

**Director: Sebastián Albertí Serrano
Tutor: Sebastián Albertí Serrano**

Doctora por la Universidad de las Islas Baleares

ABREVIATURAS:

- **LasA** elastasa A
- **LasB** elastasa B
- **LB** medio de cultivo Luria Bertani
- **LBP** proteína de unión al LPS
- **LDH** lactato deshidrogenasa
- **LPS** lipopolisacárido
- **MAGUK** proteínas guanilato quinasa asociadas a membrana
- **MH** medio de cultivo Muller-Hinton
- **MHC** complejo mayor de histocompatibilidad
- **MHC** moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad
- **MOI** multiplicidad de infección
- **OprF** proteína de membrana externa F
- **ORFs** marcos abiertos de lectura
- **PAMPs** patrones moleculares asociados a patógenos
- **PBS** tampón fosfato salino
- **RET** resistencia eléctrica transepitelial
- **RR** gemelos de arginina
- **SIDA** síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- **SST** sistema de secreción de tipo
- **T_H** células T helper
- **TLR** receptor tipo toll
- **TNF** factor de necrosis tumoral
- **TPS** sistemas de dos componentes
- **UCI** unidad de cuidados intensivos
- **UV** ultravioleta
- **ZO** zonula occludens

Publicación derivada de esta tesis doctoral:

Barbier, M., Owings, J. P., **Martínez-Ramos, I.**, Damron, F. H., Gomila, R., & Blázquez, J. (2013). Lysine Trimethylation of EF-Tu Mimics Platelet-Activating Factor To Initiate *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *MBio*, 4(3), 1–8.

*A mi familia,
en especial a mi padre y a mi madre,
a quienes debo TODO lo que soy hoy.
Gracias por vuestro Amor.*

Agradecimientos

¿Quién me iba a decir a mi que repetir un examen de inmunología para intentar subir la nota, me iba a llevar hasta completar un doctorado? Cuando terminé el examen de Septiembre, Sebastián me ofreció una beca de once meses, que acepté con mucho gusto y con ganas de ver lo que se “cocía” en su laboratorio. ¡Nunca olvidaré mi primer día en el labo! Fue un día de corte eléctrico, por lo que tocaba descongelar neveras y limpiar, ¡más divertido...! Jaja pero a partir de ahí sólo se podía ir a mejor, y así fue.

Lo que me llevó a tomar la decisión de que verdaderamente éste era el lugar en el que quería hacer mi tesis, fue la actitud de Sebastián. Me sorprendió muchísimo su gran implicación en el laboratorio y la pasión y dedicación que demuestra por su trabajo. Ver que el Jefe pasa tanto tiempo dentro del labo, que se impacienta por saber el resultado de cualquier experimento, por pequeño que sea, que recuerde el resultado de todos los experimentos realizados, incluso mejor tú misma, eso es frustrante a la par que genial. Me encantó desde el primer día. Quiero agradecerle que se fijara en mi como posible doctoranda, que confiase en mis capacidades, que me haya enseñado tantas cosas y que siempre intente despertar en mi ese espíritu crítico y curioso que todo científico debe tener.

A continuación me gustaría citar a mis grandes compis de labo, Mariette Barbier y Laura García, que desde el primer día han hecho que me sintiese como en casa. De esta tesis no sólo me llevo muchos conocimientos y experiencia laboral, sino que también me llevo dos grandes amigas, con las que he compartido momentos muy buenos y otros muy amargos. ¡Chicas, he aprendido muchísimo de vosotras, mil gracias, sois las mejores! De Laura destacaría su gran dedicación por el trabajo y capacidad de esfuerzo, y de Mariette su capacidad de organización, previsión y optimización. Mariette es mi predecesora Pseudomónica y mi gran profe, ¡te debo mucho!.

También quiero dar las gracias a todos aquellos que han pasado por el laboratorio durante estos años. Por orden cronológico al primero que tengo que agradecer es a Iván, con el que compartí mi primer año de trabajo, fiestas extralaborales y hasta una boda, ¡enhorabuena pareja!. También quiero agradecer a los becarios colaboradores: Cristina, Julián, Alejandro, Neus, Alexandra y Sebastián Jr. su ayuda y dedicación. Tengo que hacer una mención especial a dos franceses locos con los que compartí tres meses fantásticos. Por motivos administrativos me quedé sin estancia en el extranjero, así que Sebastián decidió traerme la estancia al laboratorio. Y al científico-técnico llegaron dos terremotos con los que congenié desde el principio. Son dos chicos con las ideas claras, muy trabajadores, responsables (sólo en el puesto de trabajo) y que demostraron una gran implicación en el laboratorio. Muchísimas gracias por vuestra colaboración y por ayudarme a superar mis miedos. Debo decir que ellos han sido los culpables de que haya superado la barrera (bueno, eso no era una barrera, era más bien un muro) que tenía con el inglés. ¡Chicos os echo de menos!

No puedo olvidarme de la última “chica Albertí”, Sofía, que llegó cargada de ilusión y frescura, convirtiéndose en mi cómplice en la recta final de esta tesis, ha sido un gran apoyo y le deseo lo mejor.

También quiero nombrar a Carlos, el vecino químico con el que me cruzaba por los pasillos. Muchas gracias por tantos raptos para merendar, por la compañía y por las conversaciones tan amenas. También quiero dar las gracias a todo el personal de los servicios científico-técnicos. Debo citar a Juanmi y Graciella, por darme siempre ánimos, a Maribel por su apoyo y por prestarme cada año sus libros de inglés, sin los cuales no habría podido ir avanzando en la EOI, a Rosa por su indispensable trabajo en el Maldí, su gran dedicación y su espíritu curioso. Quiero agradecer a Teresa su ayuda indispensable en el manejo y tratamiento de los animales. Es genial observar como alguien que ha trabajado durante años con animales no pierde el mimo por ellos. Y a Trinidad, que siempre se ha preocupado por mi y me ha cuidado como lo que es, ¡una Supermami!

Quiero dar las gracias también al personal de administración tanto de los servicios científicotécnicos como del Mateu Orfila, que han agilizado los trámites y, algo que es de agradecer, siempre me han atendido con una sonrisa.

También me gustaría dar las gracias al Govern de les Illes Balears, por otorgarme la beca CAIB, y al Ministerio de Educación por la FPU, que me han permitido realizar este doctorado.

A nivel extra-académico me gustaría agradecer a mis entrenadores y a los compañeros de vestuario, en especial a mi ex-pareja de Estándar, Jose Javier León, que ha sido muy comprensivo, puesto que no le he podido dedicar al baile tantas horas como hubiera debido.

También quiero acordarme de mis nenes de repaso, en especial de Marc y Dani, que se han esforzado mucho y han sabido adaptarse a mis horarios, teniendo que hacer el repaso muchas veces a las tantas de la noche. Gracias, estoy muy orgullosa de vosotros, vais a llegar muy lejos, ¡estoy segura!

No puedo olvidar a mis AMIGOS. Lo que empezó siendo una relación de compañeros de clase durante la carrera, se ha ido transformando en una amistad sólida que seguro perdurará de por vida. Antonia Oliver, David Sánchez, Raquel Martí y Jaime Fiol, siempre habéis sabido entender la poca disponibilidad que he tenido para quedar por motivos tanto laborales como personales. Pero sabéis que siempre me tenéis ahí, igual que yo sé que puedo contar siempre con vosotros, como ya me habéis demostrado tantas veces.

Gracias también a Ramón, por los paseos en barca y por los “cha-chas” y a Mercedes, por las cenitas, los salseos y por empatizar tanto conmigo.

También quiero acordarme de Ramón y Eva, que aunque en estos últimos años hemos estado más distanciados, sé que siempre estaréis ahí. ¡Os quiero!

Tengo muchísimo que agradecerle tanto a mi media naranja como a su familia. Mi cielo, Miguel Juan, que ha sido consciente desde el primer momento de lo importante que esto era para mí, la culminación de muchos años de estudio y dedicación, y que me ha animado a pasar más tiempo con mi otro novio, como él lo llama, el señor tesis doctoral. ¡Gracias cariño, te quiero!

He querido dejar para el final a las personas más importantes, sin las cuales no habría realizado esta tesis. Ellos son mi familia. Quiero dar las gracias a mis padres. TODO lo que soy hoy a nivel académico y personal se lo debo a ellos. Se han esforzado lo inimaginable por darme siempre lo mejor y es algo que nunca podré agradecerles lo suficiente. Mis padres han creído en mí mucho más que yo misma, siempre han puesto en mí muchas esperanzas y han pensado que era capaz de hacer grandes cosas, me han animado en los momentos de bajón y me han apoyado en todo. Espero no decepcionarles y quiero que sepan que estoy muy orgullosa de ellos, y deseo que ellos también lo estén de mí. Me gustaría hablar de mi hermano Jesús, que siempre ha estado a mi lado, siendo comprensivo en los momentos de estudio y estrés y me ha animado mucho. Y de mi hermano Felipe, que aunque no nos vemos todos los días sé que piensa en mí. Gracias por esos días de pesca tan divertidos.

Y ya para acabar, quiero que quede constancia de que, igual que ocurría cuando estaba estudiando la carrera, el día del examen, no era yo la que tenía el examen, sino que en mi casa lo teníamos todos; tras la lectura de esta tesis, no seré doctora, sino que en mi casa ¡SEREMOS DOCTORES!

ÍNDICE

1	Resúmenes	17
2	Introducción	9
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.1.1	Características generales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.1.2	<i>P. aeruginosa</i> como patógeno.....	12
	Infecciones comunitarias.....	13
	Infecciones nosocomiales	13
2.1.3	Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	16
	Sistemas de secreción	17
	Factores de virulencia extracelulares.....	20
	Lipopolisacárido	24
	Quorum sensing.....	26
	Flagelo.....	27
	Biofilm.....	27
2.2	La piel	29
2.2.1	Funciones de la piel	30
2.2.2	Estructura	30
	Epidermis.....	31
	Dermis	33
2.2.3	Defensas de la epidermis.....	34
	Defensas aportadas por las glándulas sudoríparas.....	34
	Defensas aportadas por la microbiota.....	34
	Defensas aportadas por los lípidos cutáneos.....	35
	Defensas aportadas por las células	35
2.2.4	Uniones celulares	37
	Uniones ocluyentes o uniones estrechas.....	37
	Uniones de adherencia o uniones intermedias.....	38
	Desmosomas	38
	Hemidesmosomas	39
	Uniones de hendidura (gap junctions).....	39
2.2.5	Composición de las uniones estrechas.....	39
	Proteínas transmembranales.....	40
	Proteínas del complejo de unión o <i>Zona Occludens</i> (ZO)	41
2.2.6	Composición de las uniones adherentes	41
	Cadherinas	41
	Integrinas.....	42
3	Hipótesis y objetivos	43
4	Materiales y métodos	47
4.1	Bacterias, plásmidos y medios de cultivo.....	49
4.2	Obtención de antisuero específico contra EF-Tu.....	50
4.3	Métodos de purificación y análisis de proteínas	50
4.3.1	Obtención de extractos celulares totales	50
4.3.2	Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares	50
4.3.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	51
4.3.4	Transferencia Western e inmunodetección de proteínas.....	51
4.3.5	Purificación de EF-Tu.....	53
4.3.6	Espectrometría de masas	53
4.3.7	Aislamiento de citoplasma y envolturas.....	54
4.3.8	Separación de la membrana interna y externa de <i>P. aeruginosa</i>	54
4.4	Técnicas genéticas.....	55
4.4.1	Transformación.....	57
4.4.2	Electroporación.....	58
4.4.3	Construcción del mutante deficiente en <i>eftM</i>	58
4.4.4	Construcción de los plásmidos pUCP18ApGw(<i>tufB</i>), pUCP18ApGw(<i>tufBK5A</i>) y pUCP18ApGw(<i>eftM</i>)	60
4.5	Ensayos con cultivos celulares	60

4.5.1	Línea celular	60
4.5.2	Ensayos de invasión y transmigración bacteriana.....	61
4.5.3	Inhibición de la transmigración por el antagonista PAFR	61
4.5.4	Medición de la viabilidad celular	62
4.5.5	Medición de la permeabilidad paracelular.....	62
4.6	Técnicas de microscopía	62
4.6.1	Microscopía electrónica de barrido	62
4.6.2	Inmunomicroscopía de fluorescencia.....	63
4.7	Técnicas con Animales.....	63
4.7.1	Modelo animal de infección en quemaduras.....	63
5	Resultados.....	65
5.1	Construcción de un mutante deficiente en la modificación de EF-Tu.....	67
5.2	Conservación del enzima en otras especies	68
5.3	Identificación de los residuos modificados por EftM en EF-Tu.....	69
5.4	Localización celular de EftM.	73
5.5	La trimetilación de EF-Tu contribuye a la invasión de <i>P. aeruginosa</i> y a la transmigración de queratinocitos polarizados.	76
5.6	<i>P. aeruginosa</i> induce cambios en la expresión de ZO-1 de los queratinocitos.....	78
5.7	Contribución de PAFR en la transmigración de <i>P. aeruginosa</i> a través de los queratinocitos.	80
5.8	La activación de NF- κ B es necesaria para la alteración de la barrera epitelial inducida por <i>P. aeruginosa</i>	81
5.9	La modificación de EF-Tu es esencial en la patogénesis de <i>P. aeruginosa</i> en la infección de heridas por quemadura.....	83
6	Discusión	85
7	Conclusiones.....	101
8	Apéndice	105
9	Bibliografía.....	109

1 Resúmenes

Introducción: *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa una gran variedad de infecciones, entre las que destacan las infecciones respiratorias agudas y crónicas y las infecciones de heridas por quemaduras. En un trabajo previo, usamos anticuerpos específicos para detectar la presencia del epítipo de fosforilcolina en la superficie bacteriana asociado al factor de elongación Tu (EF-Tu). Identificamos que el gen *eftM* (Elongation Factor Tu Modifying enzyme) es el responsable de la incorporación de fosforilcolina a EF-Tu. Además demostramos que este epítipo es crucial para la colonización inicial del tracto respiratorio por *P. aeruginosa* y el desarrollo de neumonía. En esta tesis hemos investigado la contribución de la fosforilcolina en la interacción de *P. aeruginosa* con los queratinocitos epidérmicos humanos y en las infecciones de heridas por quemadura causadas por este patógeno.

Contenido de la investigación: La proteína EF-Tu recombinante purificada de un aislado clínico y de un mutante isogénico desprovisto del gen *eftM* funcional fue analizada por espectrometría de masas. El análisis comparativo demostró que el producto de *eftM* es una metiltransferasa (EftM) que incorpora tres grupos metilo al residuo 5 de lisina de EF-Tu dando lugar a un epítipo estructuralmente igual a la fosforilcolina. Mediante la combinación de técnicas de fraccionamiento celular, microscopía electrónica e inmunología, demostramos que EftM trimetila EF-Tu en el citoplasma, el cual es posteriormente transportado a la membrana externa, dejando el residuo 5 trimetilado expuesto hacia el exterior. Los ensayos de invasión y trans migración con cultivos de queratinocitos humanos polarizados infectados con la cepa parental o el mutante en *eftM* demostraron que la trimetilación de EF-Tu media la migración de *P. aeruginosa* a través de la barrera epitelial. Esto es debido a que la cepa parental es capaz de alterar, de forma más eficiente que el mutante, la permeabilidad de la barrera epitelial mediante la reducción de la expresión de ZO-1, una proteína clave para la integridad del epitelio. Los ensayos con un antagonista del receptor del factor activador de plaquetas (PAFR) demostraron que este receptor media la interacción de *P. aeruginosa* con los queratinocitos a través de EF-Tu trimetilado. Sin embargo, la reducción de ZO-1 no es debida directamente a la interacción EF-Tu-PAFR, sino que está inducida por la activación, por parte de *P. aeruginosa*, del factor de transcripción celular NF- κ B. Finalmente, los experimentos en un modelo murino de infección por quemadura demostraron que la mutación de *eftM* reduce notablemente la virulencia y la capacidad de diseminación de *P. aeruginosa*.

Conclusiones: Se ha identificado el gen *eftM*, que codifica una nueva metiltransferasa que incorpora tres grupos metilo al residuo 5 de lisina de EF-Tu. EftM está muy conservado y ampliamente distribuido entre especies y es necesario y suficiente para metilar EF-Tu en *P. aeruginosa* o en otros sistemas heterólogos. EF-Tu está en la membrana externa exponiendo la región N-terminal trimetilada hacia el exterior. Dicha trimetilación facilita la invasión y trans migración bacteriana a través de queratinocitos humanos mediante la interacción con PAFR. *P. aeruginosa* reduce los niveles de proteína ZO-1 incrementando la permeabilidad paracelular de la barrera epitelial, proceso mediado por la activación de NF- κ B. La carencia de

Resumen

EftM reduce la virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo murino de infección de quemadura. La nueva metiltransferasa podría ser una nueva diana para el diseño de fármacos contra *P. aeruginosa*.

Introducció: *Pseudomonas aeruginosa* és un patogen oportunista que causa una gran varietat d'infeccions, entre les quals destaquen les infeccions respiratòries agudes i cròniques i les infeccions de ferides per cremada. A un treball previ, vàrem utilitzar anticossos específics per detectar la presència de l'epítot de fosforilcolina a la superfície del bacteri associat al factor d'elongació Tu (EF-Tu). Vàrem identificar que el gen *eftM* (Elongation Factor Tu Modifying enzyme) és el responsable de la incorporació de fosforilcolina a EF-Tu. A més a més demostrarem que aquest epítot és clau per la colonització inicial del tracte respiratori per *P. aeruginosa* i el desenvolupament de pneumònia. En aquesta tesi hem investigat la contribució de la fosforilcolina a la interacció de *P. aeruginosa* amb els queratinocits epidèrmics humans i a les infeccions de ferides per cremades causades per aquest patogen.

Contingut de la recerca: La proteïna EF-Tu recombinant purificada d'un aïllament clínic i d'un mutant isogènic desproveït del gen *eftM* funcional va ser analitzat per espectrometria de masses. L'anàlisi comparativa va demostrar que el producte de *eftM* és una metiltransferasa (EftM) que incorpora tres grups metil al residu 5 de lisina de EF-Tu donant lloc a un epítot estructuralment igual a la fosforilcolina. Mitjançant la combinació de tècniques de fraccionament cel·lular, microscopia electrònica i immunologia, hem demostrat que EftM trimetila EF-Tu al citoplasma, el qual és posteriorment transportat a la membrana externa, deixant el residu 5 trimetilat exposat cap a l'exterior. Els assajos d'invasió i transmigració amb cultius de queratinocits humans polaritzats infectats amb la soca parental o el mutant d'*eftM* demostraren que la trimetilació d' EF-Tu facilita la migració de *P. aeruginosa* a través de la barrera epitelial. Això és degut al fet que la soca parental és capaç d'alterar, de forma més eficient que el mutant, la permeabilitat de la barrera epitelial mitjançant la reducció de l'expressió de ZO-1, una proteïna clau per a la integritat de l'epiteli. Els assajos amb un antagonista del receptor del factor activador de plaquetes (PAFR) demostraren que aquest receptor actua com a intermediari en la interacció de *P. aeruginosa* amb els queratinòcits a través d'EF-Tu trimetilat. No obstant això, la reducció de ZO-1 no és deguda directament a la interacció EF-Tu-PAFR, sino que està induïda per l'activació, per part de *P. aeruginosa*, del factor de transcripció cel·lular NF- κ B. Finalment, els experiments a un model murí d'infecció per cremada demostraren que la mutació d'*eftM* redueix la virulència i la capacitat de disseminació de *P. aeruginosa*.

Conclusions: S'ha identificat el gen *eftM*, que codifica una nova metiltransferasa que incorpora tres grups metil al residu 5 de lisina d'EF-Tu. EftM està molt conservat i àmpliament distribuït entre espècies i és necessari i suficient per metilar EF-Tu a *P. aeruginosa* o a altres sistemes heteròlegs. EF-Tu està a la membrana externa exposant la regió N-terminal trimetilada cap a l'exterior. Aquesta trimetilació facilita la invasió i transmigració bacteriana a través de queratinocits humans mitjançant la interacció amb PAFR. *P. aeruginosa* redueix els nivells de proteïna ZO-1, incrementant la permeabilitat paracel·lular de la barrera epitelial, procés mitjançat per l'activació de NF- κ B. La manca d'EftM redueix la virulència de *P. aeruginosa* a

Resumen

un model murí d'infecció de cremada. La nova metiltransferasa podria ser una nova diana pel disseny de fàrmacs contra *P. aeruginosa*.

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen responsible of a wide range of infections including acute and chronic respiratory infections and wound burn infections. In a previous study, we used specific antibodies to detect the presence of the phosphorylcholine epitope on the bacterial surface linked to the elongation factor Tu (EF-Tu). We identified the gene *eftM* (Elongation Factor Tu Modifying enzyme) as the responsible of the modification of EF-Tu with phosphorylcholine. In addition, we demonstrated that this epitope is crucial for initial colonization of the respiratory tract by *P. aeruginosa* and for development of pneumonia. In this Thesis we have investigated the contribution of the phosphorylcholine in the interaction of *P. aeruginosa* with the human epidermic keratinocytes and in the burn wound infections caused by this pathogen.

Research: A tandem mass spectrometry analysis was chosen to compare recombinant EF-Tu purified from a clinical isolate and from an isogenic *eftM* deficient mutant. Comparative analysis shown that the product of *eftM*, is a methyltransferase (EftM) that transfers three methyl groups to the lysine residue 5 of EF-Tu resulting in a chemical structure similar to phosphorylcholine. Through a combination of approaches, including sub-cellular fractionation, electronic microscopy and immunological techniques, we demonstrated that EftM trimethylates EF-Tu in the cytoplasm, which is subsequently transported to the outer membrane, leaving the trimethylated residue 5 exposed outwards. Invasion and transmigration experiments with cultured human polarized keratinocytes infected with the wild-type strain or the *eftM* mutant demonstrated that the trimethylation of EF-Tu mediates the migration of *P. aeruginosa* through the epithelial barrier. Accordingly, the wild-type strain increased the paracellular permeability and reduced the expression of ZO-1, a key protein for the integrity of the epithelial barrier, more efficiently than the mutant. An antagonist of the platelet activating factor receptor (PAFR) reduced the invasion and transmigration of the wild type strain but had no effect on the mutant suggesting that PAFR on the keratinocytes mediates the interaction with the modified EF-Tu. However, reduction of ZO-1 is not directly due to the interaction EF-Tu-PAFR, but is due to the activation of the transcription factor NF- κ B induced by *P. aeruginosa*. Finally, we demonstrated the mutation of *eftM* impaired the virulence and the dissemination capacity of *P. aeruginosa* in murine model of wound burn infection.

Conclusions: We have identified the gen *eftM*, encoding a novel methyltransferase, which links three methyl groups to the lysine residue 5 of EF-Tu. EftM is conserved and widely distributed among different species and is sufficient and necessary to methylate EF-Tu in *P. aeruginosa* and other heterologous systems. EF-Tu is on the outer membrane exposing the N-terminal trimethylated region outward. Trimethylation of EF-Tu promotes invasion and transmigration of the microorganisms via PAFR. Activation of NF- κ B by *P. aeruginosa* induces the reduction of ZO-1 and increase the paracellular permeability of the epithelial barrier. Mutation of *eftM* reduces the virulence of *P. aeruginosa* in a murine model of wound burn infection. This opens up new avenues for the development of new drugs targeting this new methyltransferase.

2 Introducción

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1 Características generales de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la clase de las gamma proteobacterias y a la familia *Pseudomonadaceae*. Es un bacilo Gram negativo, no formador de esporas, cuyas dimensiones oscilan entre los 0,5y 0,8µm de ancho y los 1,5 y 3µm de largo. Es aeróbico, pero puede crecer en ausencia de oxígeno utilizando el NO₃ como aceptor de electrones. Es una bacteria de vida libre, móvil gracias a su flagelo polar (figura 1), que la convierte en una potente nadadora en ambientes acuáticos (Holt et al., 1994). Es oxidasa y catalasa positiva y no fermentadora de la lactosa. En la naturaleza puede encontrarse como organismo unicelular o formando biofilms (agrupación de microorganismos en comunidad, que les confiere ventajas frente a la vida libre, aportando mayor resistencia a sustancias químicas agresivas, antibióticos y a los componentes del sistema inmunitario cuando están provocando una infección). Es ubicua, capaz de vivir en una gran variedad de ambientes y de adaptarse a muchos nichos ecológicos. Se encuentra en el agua, el suelo, las plantas y los tejidos animales. Tiene la capacidad de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos como fuente de nutrientes, lo que le confiere la capacidad de colonizar hábitats en los que éstos son limitados. Su temperatura óptima de crecimiento es 37°C, aunque puede crecer a temperaturas superiores a los 42°C. Ciertas cepas también presentan crecimiento incluso a 4°C (Zachariah & Liston, 1973). Es resistente a altas concentraciones de sales y a algunos antisépticos y antibióticos.

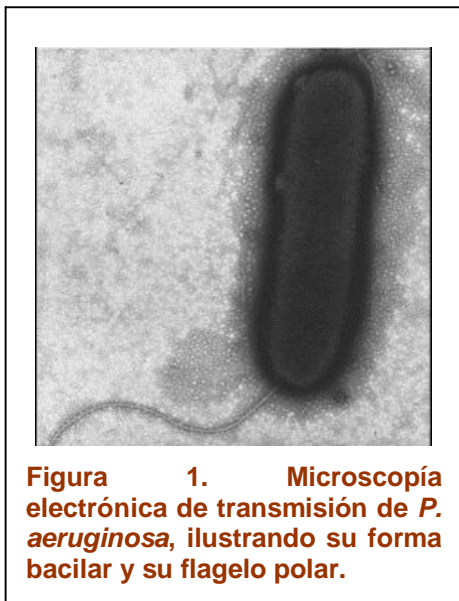


Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de *P. aeruginosa*, ilustrando su forma bacilar y su flagelo polar.

Las cepas de *P. aeruginosa* producen dos tipos de pigmentos hidrosolubles mayoritarios: la pioverdina (pigmento de color amarillo-verdoso y fluorescente cuando se irradia con luz ultravioleta (UV)) y la piocianina (color azul). Este último pigmento se produce en medios con bajo contenido en hierro y el color azul es característico de las infecciones supurativas causadas por este microorganismo. *P. aeruginosa* también puede producir otros pigmentos como la piorubina (roja) o la piomelanina (marrón).

PAO1 es, junto con PA14, la cepa mejor caracterizada de la especie *P. aeruginosa*. Fue aislada por primera vez en 1955 de una herida de un paciente con quemaduras infectadas. Posee un genoma de aproximadamente 6,3 millones de pares de bases (estructurado en un único cromosoma circular), que está completamente secuenciado (Stover et al., 2000) (figura 2). Este gran

genoma confiere a la bacteria la versatilidad de adaptarse a distintos ambientes. Presenta una gran cantidad de genes de regulación, así como genes relacionados con la locomoción, transporte y expulsión de sustancias, factores de virulencia, sistemas quimiotácticos (que le

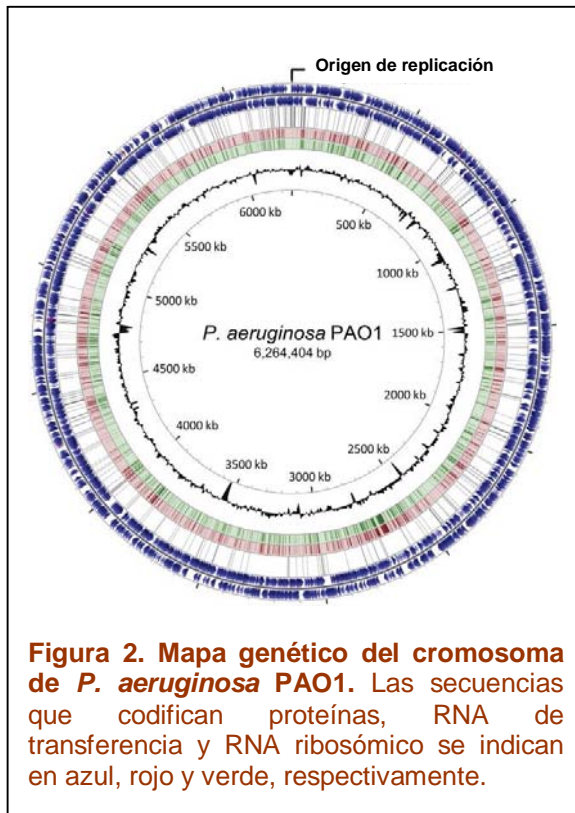


Figura 2. Mapa genético del cromosoma de *P. aeruginosa* PAO1. Las secuencias que codifican proteínas, RNA de transferencia y RNA ribosómico se indican en azul, rojo y verde, respectivamente.

permiten responder a cambios ambientales) y formación de biofilm (Fajardo et al., 2008; Reman et al., 2010). Se estima que el genoma de *P. aeruginosa* posee codificados 5.570 genes y presenta unos 550 marcos abiertos de lectura (ORFs), de los cuales se desconoce la función de más de la mitad; lo que muestra la gran complejidad genómica de este microorganismo. Una curiosidad acerca del genoma de la bacteria, es la localización de los genes que intervienen en la virulencia distribuidos a lo largo de todo el cromosoma (O'Toole & Kolter, 1998), al contrario de lo que ocurre en otros patógenos, en los que dichos genes se localizan en las llamadas islas de patogenicidad (regiones de DNA que contribuyen a la virulencia) (Battle et al., 2008).

Debido a su gran ubicuidad, ya comentada anteriormente, *P. aeruginosa* se ha aislado de una gran variedad de hábitats, con predilección por las zonas húmedas (Holt et al., 1994). Dicha capacidad, hace que este microorganismo sea un problema en el ámbito hospitalario. En este sentido, se han descrito aislamientos en soluciones acuosas, como jabones, soluciones para lentillas, colirios, fluidos de diálisis, cosméticos, aguas de piscinas y baños, e incluso en instrumental hospitalario.

2.1.2 *P. aeruginosa* como patógeno

Probablemente, los primeros indicios sobre *P. aeruginosa* como patógeno humano se pueden encontrar en el año 1862, cuando Luke observó partículas con forma de barra en el pus verde-azulado de algunas infecciones. Una coloración similar había sido observada también por Sedillot en apósitos quirúrgicos. Ahora se sabe que dicho color es debido a los pigmentos producidos por *P. aeruginosa*. El microorganismo fue aislado por primera vez en 1882, por Gessard, de un paciente infectado y fue inicialmente nombrado como *Bacillus pyocyaneus*.

Las características anteriormente enumeradas de *P. aeruginosa*: ubicuidad, permanencia en el ambiente, resistencia a los antibióticos, flexibilidad nutricional y de requerimientos metabólicos,

ayudan a explicar la frecuencia y éxito con la que ésta actúa como patógeno oportunista. *P. aeruginosa* no es capaz de infectar a individuos sanos, puesto que no puede atravesar por sí misma la piel, y no es resistente a los componentes de un sistema inmunitario eficiente. Pero puede encontrarse formando parte de la microbiota normal de un individuo sano, sin causarle una infección. *P. aeruginosa* ha sido aislada de las axilas, tracto respiratorio, faringe y heces de individuos sanos. El problema aparece cuando los sistemas corporales de contención de microorganismos fallan, rompiéndose las barreras físicas (heridas, quemaduras,...) y/o apareciendo una depresión del sistema inmune (pacientes con SIDA, cáncer,...). Es en este momento en el que se producen las infecciones, que se definen como la penetración, multiplicación e invasión de un agente infeccioso en el cuerpo. Además, la presencia del microorganismo en el ambiente le permite una recolonización constante.

P. aeruginosa es considerado el principal patógeno oportunista humano y causa infecciones tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario.

▪ Infecciones comunitarias

Cuando se habla de infecciones en la comunidad o comunitarias se hace referencia a aquellas infecciones adquiridas fuera del ambiente hospitalario.

P. aeruginosa es responsable de un 10% del total de infecciones adquiridas en la comunidad. Las infecciones superficiales más comunes causadas por *P. aeruginosa* son: foliculitis (infección localizada en el folículo piloso) y otitis (infección de oído), ambas relacionadas con personas que practican deportes de piscina. Las infecciones profundas del oído son muy peligrosas, pudiendo llegar a causar daños craneales (Bhandary et al., 2002). También es responsable de brotes de neumonía acaecidos en piscinas. Otro tipo de infecciones que causa son las oculares, asociadas a usuarios de lentes de contacto, ya que este microorganismo puede sobrevivir en el líquido desinfectante de las lentillas (Lakkis, 2001). También es responsable de causar intertrigo, infección cutánea que se da en zonas corporales con constante humedad, como entre los dedos de los pies, las ingles o las axilas (Kalkan et al., 2013). *P. aeruginosa* también ocasiona infecciones en el tracto urinario y gastrointestinal (Cole et al., 2014; Yeung & Lee, 1998).

▪ Infecciones nosocomiales

El término nosocomial procede del griego “nosokomeain”, que significa “hospital” y a su vez ésta deriva de la palabra griega “nosos”, que significa “varias enfermedades.” Por tanto, una infección nosocomial se define como aquella infección que se da en un paciente, en el que no existen evidencias de que el agente causal se encontrara presente, o en periodo de incubación, en el momento de su ingreso en el hospital y que, por tanto, se ha adquirido en el ámbito hospitalario, aunque su manifestación se produzca tras la salida del mismo.

P. aeruginosa es responsable del 10% del total de infecciones nosocomiales y es la 4ª bacteria más frecuentemente aislada (Diekema et al., 1999). Su presencia en el ámbito hospitalario es ubicua, y se encuentra contaminando el suelo, las camas, los grifos y las manos del personal sanitario (Chitkara & Feierabend, 1981). Las infecciones más habituales y, por tanto más estudiadas, son las que provoca en el tracto respiratorio. En este sentido, *P. aeruginosa* es la segunda causa de neumonía nosocomial, siendo aislada en el 20% de los casos y sólo superada por *Staphylococcus aureus* (Rello et al., 2003). Esta tasa se incrementa notablemente en determinadas unidades hospitalarias como, por ejemplo, las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), en las que *P. aeruginosa* es el primer agente causal de neumonía en pacientes con ventilación mecánica, con una tasa de mortalidad del 50% (Vincent & Jacobs, 2003). En el conjunto de todas las infecciones, *P. aeruginosa* es el patógeno Gram negativo más frecuentemente aislado en las UCI (10% del total), particularmente en pacientes con patologías respiratorias, heridas o quemaduras (Lynch, 2001; Mousa, 1997; Vincent & Jacobs, 2003). Las infecciones causadas por este microorganismo se diferencian del resto por su severidad y dificultad en el tratamiento, debido a la frecuente aparición de cepas multi-resistentes a los antibióticos habituales.

Además, *P. aeruginosa* es uno de los principales responsables de las infecciones respiratorias crónicas. Así, por ejemplo, este microorganismo es el principal responsable de la morbilidad y mortalidad en los pacientes con fibrosis quística (FQ), el 70-80% de estos pacientes están infectados por este microorganismo (Lyczak et al., 2002); es la causa más importante de infecciones crónicas en pacientes con bronquiectasias, donde se asocia con un grave deterioro de la función pulmonar y una peor calidad de vida (Evans & Fiedler, 1996); y es reconocido como un marcador de inflamación intensa en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (Hill et al., 2000), una enfermedad muy prevalente en nuestro entorno.

Infecciones de herida por quemadura

Una vez transcurridas las primeras 24-48h después de la quemadura, en las que es vital evitar la muerte del paciente por shock sistémico, el principal problema pasan a ser las infecciones, siendo la causa de muerte en un 75% de los casos (Ansermino & Hemsley, 2004; Barrow et al., 2000; D'Avignon et al., 2010; Fitzwater et al., 2003).

La superficie de la herida provocada por la quemadura es, en principio, estéril, pero en menos de 48h es colonizada por varios microorganismos, ya que en la superficie de la herida se acumulan proteínas coaguladas, que sirven de nutrientes, favoreciendo su proliferación. Además, la situación se agrava por la disminución de los mecanismos de defensa físicos e inmunológicos del huésped. En ese sentido, el deterioro de la piel permite que los microorganismos alcancen el torrente sanguíneo abriéndose paso a través del tejido quemado. Desde el punto de vista inmunológico, se reducen los niveles séricos de inmunoglobulinas, fibronectina y complemento (Deitch et al., 1985; Felts et al., 1999; Hamrahi et al., 2012) y la

actividad de los neutrófilos, monocitos y macrófagos (Jeyapaul et al, 1984). Además, se altera el contenido de los péptidos antimicrobianos naturales, que son producidos en la parte más profunda de la piel (Hamrahi et al., 2012).

Las bacterias Gram positivas presentes en las glándulas sudoríparas y en los folículos pilosos son las primeras en colonizar las heridas por quemadura, aunque serán rápidamente reemplazadas por bacterias Gram negativas. Estas bacterias Gram negativas pueden tener un origen endógeno y proceder del tracto respiratorio o gastrointestinal, o bien pueden provenir de una fuente exógena, ya sea del personal sanitario, de los instrumentos o del ambiente (Keen et al., 2010; Rezaei et al., 2011; Weber & McManus, 2004).

P. aeruginosa es el microorganismo más aislado de heridas por quemadura (Belba et al., 2013; Guggenheim et al., 2009; Taneja et al., 2013) y el que con mayor frecuencia causa bacteremia, lo que indica que *P. aeruginosa* tiene la capacidad de migrar desde la quemadura hasta la sangre, diseminándose por todo el organismo del paciente (Dai et al., 2013). La frecuencia con la que se aísla este patógeno se incrementa notablemente en pacientes con largas estancias hospitalarias (superiores a dos semanas) o que sufren quemaduras en una extensión corporal superior al 50%, siendo la principal causa de muerte en estos pacientes (Fadeyibi et al., 2013; Keen et al., 2010).

A la severidad de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* se le une la elevada frecuencia con la que aparecen aislados resistentes a los antibióticos de uso habitual, como la ceftazidima o cefotaxima (Zhang et al., 2005). También se ha utilizado la tobramicina, el imipenem o la polimixina B como alternativa a los tratamientos habituales (Geyik et al., 2003; Rezaei et al., 2011), aunque en los últimos años ha aumentado la frecuencia de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a estos tratamientos (Jabalameli et al., 2012; Ranjbar et al., 2011). Este hecho obliga a la búsqueda de estrategias alternativas.

Una alternativa a la utilización de antibióticos sería la vacunación para prevenir las infecciones. En este sentido, se han desarrollado vacunas basadas en la flagelina A, la exotoxina A y en el lipopolisacárido (LPS), que han demostrado su eficacia en el tratamiento de la infección de quemaduras por *P. aeruginosa* en modelos animales (Cryz et al., 1984; Faezi et al., 2014; Manafi et al., 2009). También se han realizado con éxito ensayos clínicos en pacientes con quemaduras, que han sido inmunizados con vacunas polivalentes o diseñadas específicamente a partir de proteínas de membrana externa de *P. aeruginosa* (Bbukowska et al., 1989; Kim et al., 2000).

Uno de los principales problemas en la infección de las quemaduras es el desarrollo de biofilms, que dificultan su tratamiento. El tratamiento propuesto en estos casos consiste en la combinación de diferentes antibióticos (bacitracina, neomicina y polimixina B) en forma de ungüento, para reducir el desarrollo del biofilm (Hammond et al., 2011).

2.1.3 Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Tal como hemos mencionado anteriormente, prácticamente todas las infecciones causadas por *P. aeruginosa* van asociadas a una disminución de la capacidad defensiva del huésped. Si bien esta situación puede conllevar la infección por numerosos patógenos oportunistas, hay tres tipos de infecciones en las que *P. aeruginosa* predomina y por tanto, pueden aportar más información sobre los factores de virulencia que este microorganismo utiliza para convertirse en uno de los principales patógenos humanos. Estas son; 1) bacteremias en pacientes quemados, 2) infecciones respiratorias crónicas en pacientes con FQ, y 3) queratitis ulcerosa aguda en usuarios de lentes de contacto. Las observaciones clínicas y la evaluación experimental en modelos animales o en ensayos *in vitro* ha permitido identificar, uno a uno, los factores de virulencia que *P. aeruginosa* dispone para causar estas infecciones, lo que ha permitido entender mejor, a nivel molecular y celular, los mecanismos de patogenicidad de este microorganismo. La aparición de las técnicas de análisis masivo ha confirmado el papel de los factores de virulencia ya conocidos y ha ampliado la lista de éstos, identificando nuevos factores potencialmente implicados en la patogénesis de *P. aeruginosa*.

En este apartado se pretende dar una descripción de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* mejor caracterizados, haciendo especial hincapié en aquellos implicados en las infecciones que se dan en pacientes con quemaduras.

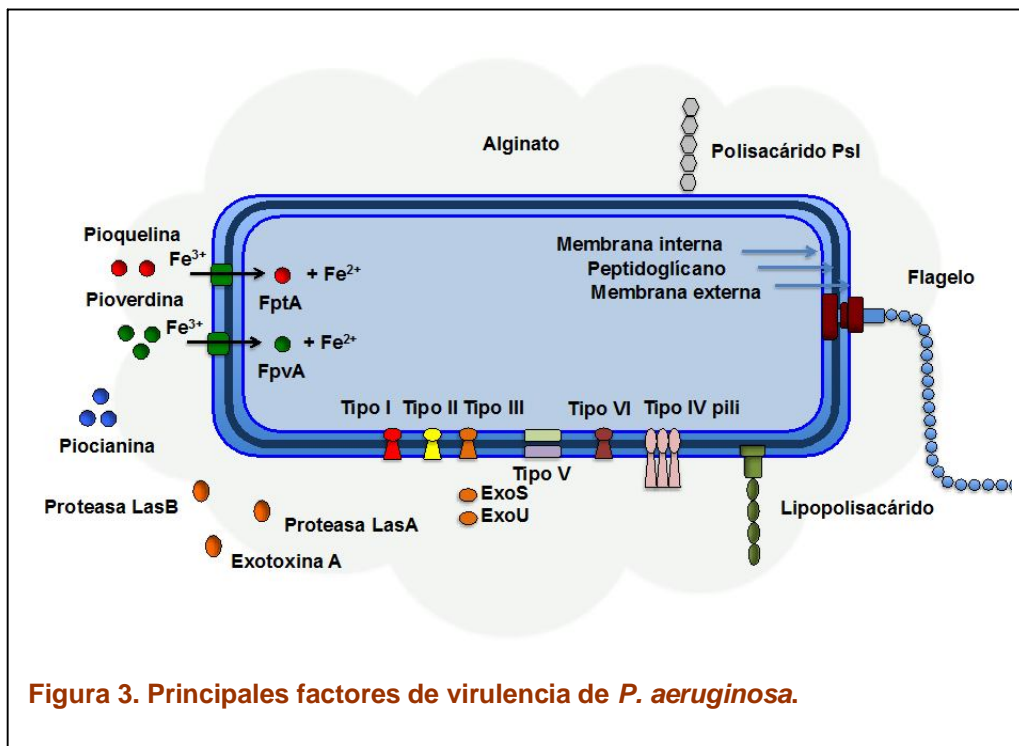


Figura 3. Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*.

Introducción

▪ Sistemas de secreción

P. aeruginosa es capaz de manipular la respuesta celular del huésped en su propio beneficio mediante la acción de una serie de proteínas que pueden ser liberadas al medio externo, quedarse unidas a la misma bacteria o ser inyectadas en el citoplasma de las células del huésped. A estos fenómenos les denominamos secreción y a los componentes bacterianos implicados en la secreción de estas proteínas los conocemos como sistemas de secreción. Hasta el momento se han descrito 6 tipos distintos de sistemas de secreción en las bacterias y *P. aeruginosa* dispone de todos excepto del tipo IV (Bleves et al., 2010; Ma et al., 2003). A continuación se describen las características principales de cada uno y su papel en la virulencia de este patógeno.

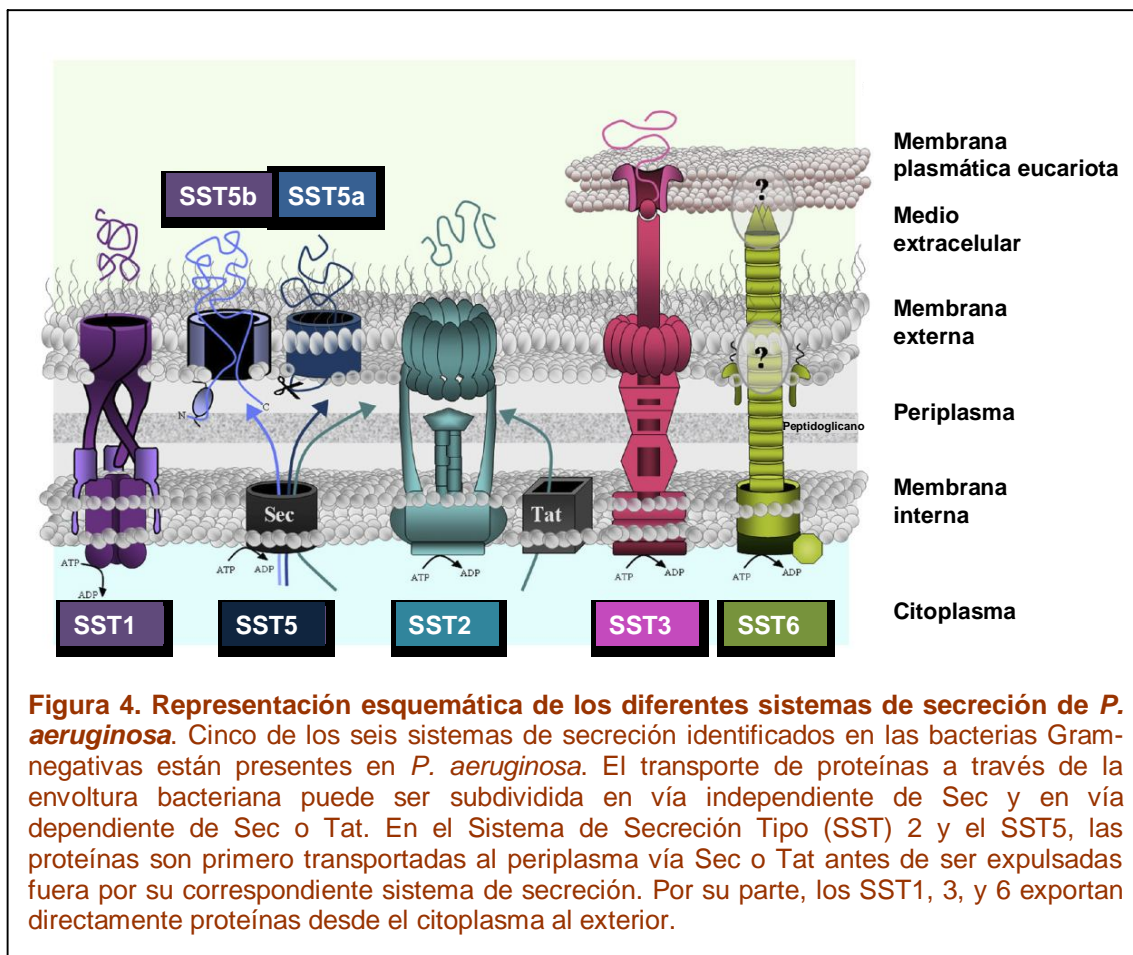


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes sistemas de secreción de *P. aeruginosa*. Cinco de los seis sistemas de secreción identificados en las bacterias Gram-negativas están presentes en *P. aeruginosa*. El transporte de proteínas a través de la envoltura bacteriana puede ser subdividido en vía independiente de Sec y en vía dependiente de Sec o Tat. En el Sistema de Secreción Tipo (SST) 2 y el SST5, las proteínas son primero transportadas al periplasma vía Sec o Tat antes de ser expulsadas fuera por su correspondiente sistema de secreción. Por su parte, los SST1, 3, y 6 exportan directamente proteínas desde el citoplasma al exterior.

Sistema de secreción tipo I (SST1)

El SST1 es el más simple de los sistemas de secreción y está constituido por una proteína de membrana externa conectada, gracias a una proteína adaptadora, a un sistema transportador tipo ABC, que proporciona energía para el transporte y que está insertado en la membrana interna. En *P. aeruginosa* se han identificado dos SST1, el sistema Apr y el sistema Has. El primero está implicado en la secreción de la proteasa alcalina Apr, reconocido factor de

virulencia implicado en varias infecciones (Matsumoto, 2004). El segundo secreta la proteína HasA que es un hemóforo que capta hierro en las primeras etapas del proceso infeccioso (Wandersman & Delepelaire, 2004).

Sistema de secreción tipo II (SST2)

El SST2 es uno de los sistemas más versátiles que las bacterias Gram-negativas utilizan para secretar exoproteínas al medio y es único en su capacidad para facilitar la translocación de exoproteínas multiméricas que se han formado y asociado en el periplasma. *P. aeruginosa* dispone de dos SST2; el sistema Xcp y el sistema Hxc, que sólo se expresa en condiciones limitantes de fosfato. Tal como se puede apreciar en la tabla 1, el sistema Xcp está implicado en la secreción de numerosas exoproteínas implicadas en la virulencia de *P. aeruginosa*, algunas de las cuales han sido descritas anteriormente.

Sistema de secreción tipo III (SST3)

Un amplio número de patógenos están equipados con SST3 que permite inyectar proteínas tóxicas, llamadas efectores, en el citoplasma de las células del huésped. El contacto entre la bacteria y la célula eucariota es el estímulo que activa la translocación de los efectores a través, tanto de la envoltura bacteriana como de la membrana plasmática eucariota, en un mecanismo que consta de un solo paso. Una vez en la célula, los efectores pueden modificar la respuesta del huésped simulando la actividad de proteínas propias del huésped.

En *P. aeruginosa* PAO1 hay cinco operones distintos localizados en un solo locus genético que están implicados en la biogénesis y control de la maquinaria de secreción y translocación del SST3. En *P. aeruginosa* el filamento con forma de aguja que inyecta los efectores es un tubo hueco recto de una longitud de 60-80nm y 7nm de ancho constituido por subunidades de la proteína PscF. Una vez la aguja está ensamblada, los efectores son transportados a través de ella hasta la célula huésped. La lista de efectores inyectados de esta forma en las células huésped se muestran en la tabla 1. Habitualmente, las cepas de *P. aeruginosa* presentan diferentes combinaciones de genes que codifican para distintos efectores. De esta forma, podemos dividir a las cepas en dos grupos. Las cepas citotóxicas que presentan los genes *exoU*, *exoT*, y algunas veces *exoY*, y las cepas invasoras que presentan los genes *exoS*, *exoT* y frecuentemente *exoY* (Wolfgang et al., 2003). En los aislados clínicos la presencia de *exoS*, que es incompatible con *exoU*, es más frecuente (Kulasekara et al., 2006). Las cepas productoras de ExoU causan la muerte celular por necrosis, mientras que las productoras de ExoS son internalizadas por las células lo que supone la muerte celular por apoptosis (Hauser, 2009). Además ExoS y ExoT confieren capacidad antifagocítica a la bacteria gracias a su acción sobre la actina del citoesqueleto. ExoS y ExoU inhiben la producción de interleuquinas por parte de los macrófagos alveolares y modulan la respuesta inflamatoria.

Introducción

Sistema secreción	Proteína secretada	Características
SST1 (Apr)	AprA (PA1249) AprX (PA1245) HasAp (PA3407)	Proteasa alcalina Desconocida Proteína de adquisición del grupo hemo
SST2 (Xcp)	LasB (PA3724) Las A (PA1871) PlcH (PA0844) PlcN (PA3319) PlcB (PA0026) CbpD (PA0852) ToxA (PA1948) PmpA (PA0572) PrpL (PA4175) LipA (PA2862) LipC (PA4813) PhoA (PA3296) PaAP (PA2939)	Metaloproteinasa (elastasa B) Metaloproteinasa (elastasa A) Fosfolipasa C hemolítica Fosfolipasa C no hemolítica Fosfolipasa C específica de fosfatidil-etanolamina Proteína de unión a la quitina Toxina AB, ADP-ribosil transferasa Hipotética metaloproteasa Endopeptidasa específica para la lisina (Proteasa IV) Hidrolasa triacil glicerol acil Lipasa Fosfatasa alcalina Aminopeptidasa
SST2 (Hxc)	LapA (PA0688)	Fosfatasa alcalina
SST3	ExoS (PA3841) ExoT (PA0044) ExoY (PA2191)	ADP-ribosil transferasa y prot. activadora Rho y GTPasa ADP-ribosil transferasa y prot. activadora Rho y GTPasa Adenilato ciclasa
SST5a	EstA (PA5112)	Esterasa
SST5b	LepA (PA4540) CupB5 (PA4082)	Exoproteasa Hemaglutinina
SST6 (HSI-I)	Hcp1 (PA0085)	Formación de nanotubos
Tabla 1. Sistemas de secreción presentes en <i>P. aeruginosa</i>		

Sistema de secreción tipo V (SST5)

El SST5 es uno de los sistemas de secreción más simple descritos en bacterias Gram-negativas. Permite la secreción de proteínas de gran tamaño que participan en la adhesión y virulencia de *P. aeruginosa*. La translocación de estas proteínas se da en un proceso que consta de dos pasos. En primer lugar, la proteína cruza la membrana interna, vía la maquinaria de transporte Sec, y, posteriormente es transportada a través de la membrana externa gracias a una proteína que actúa como canal. Las proteínas así secretadas pueden permanecer unidas a la bacteria o ser liberadas al medio. Dentro de los SST5 existen dos subtipos; los autotransportadores (AT) y los sistemas de dos componentes (TPS). EstA es el único sistema de tipo autotransportador bien caracterizado en *P. aeruginosa*. Se ha demostrado que EstA está implicado en la producción de ramnolípidos, en la movilidad de la bacteria y en la producción de biofilm (Wilhelm et al., 2007).

Por su parte, a pesar de que en el genoma de PAO1 se han anotado hasta seis posibles SST5 del tipo TPS, sólo dos han sido caracterizados. El transportador TpsB4, denominado LepB es necesario para la secreción de la proteína LepA que es una proteasa que activa el factor de transcripción NF- κ B gracias a su interacción con los receptores PAR-1, -2, ó -4 humanos, estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias (Kida et al., 2008). Por otra parte, el transportador Tps6 está implicado en el ensamblaje de la fimbria CupB que puede actuar como adhesina y está implicada en la formación de biofilms (Vallet et al., 2004).

Sistema de secreción tipo VI (SST6)

Este sistema de secreción es el último descubierto en *P. aeruginosa* aunque está ampliamente distribuido entre las bacterias Gram negativas. El genoma de *P. aeruginosa* presenta 3 locus que codifican componentes del SST6 y que se denominan *HSI-I*, *HSI-II* y *HSI-III*, con aproximadamente 20 genes cada uno. La proteína Hcp1 es el único producto de secreción conocido de este sistema. Se ha detectado esta proteína en el esputo de pacientes con FQ (Mougous et al., 2006), sin embargo, no se conoce cual es su papel en la virulencia de este patógeno.

▪ Factores de virulencia extracelulares

P. aeruginosa produce una amplia variedad de productos que son secretados al exterior y contribuyen a la patogénesis de la infección. Estos incluyen exoproteasas, exotoxinas, fosfolipasas, fenacinas, fosfatasa alcalina y ramnolípidos entre otros.

Dentro de estos productos cabe señalar en primer lugar las exoproteasas, entre las que destacan las proteasas LasA y LasB, también conocidas como elastasas.

La elastasa A es una metaloproteinasa de zinc de 20kDa con actividad elastolítica que actúa predominantemente en los enlaces peptídicos glicina-glicina. Aunque su especificidad reduce

su espectro de actuación, se sabe que puede potenciar la actividad de LasB. Al igual que LasB, LasA contribuye a la degradación de las barreras epiteliales y endoteliales. Concretamente, LasA estimula la liberación del ectodominio de la glicoproteína sindecano-1 que a su vez secuestra péptidos antimicrobianos catiónicos (Park et al., 2000). Además LasA subvierte la respuesta inflamatoria mediante la formación de complejos de quimiocinas específicas con los neutrófilos (Park et al., 2000).

La elastasa B (LasB), es una metaloproteínasa de zinc con capacidad elastolítica y de un peso molecular de 33kDa que está codificada por el gen *lasB*. También conocida como pseudolisina, LasB es capaz de dañar los tejidos del huésped a través de la hidrólisis de los componentes de la matriz extracelular y por alteración de las barreras epiteliales y endoteliales mediante el ataque de las uniones intercelulares (Azghani, 1996; de Bentzmann et al., 2000). *In vitro*, LasB degrada numerosos componentes del sistema inmune innato y adaptativo, incluyendo las proteínas surfactantes A y D (Mariencheck et al., 2003), citocinas y quimiocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-8) (Parmely et al., 1990) y péptidos antibacterianos (Schad et al., 1987). Además, la elastasa B inactiva la inmunoglobulina A secretora, inmunoglobulina G, el componente C3 del complemento y la lisozima (Diebel et al., 2009; Jacquot et al., 1985; Kharazmi, 1991; Schultz & Miller, 1974).

Ambas elastasas contribuyen a la diseminación y desenlace fatal de las infecciones en un modelo murino de infección de quemadura (Rumbaugh et al., 1999).

Otro factor de virulencia secretado por *P. aeruginosa* es la exotoxina A que inhibe la síntesis de proteínas de las células del huésped por ribosilación del factor de elongación 2. Más del 90% de los aislados clínicos expresan esta toxina y los niveles altos de expresión se asocian con la gravedad de la infección (Matar et al., 2002), lo que denota la importancia de este factor de virulencia. En el caso concreto de las infecciones de lesiones por quemadura, Fogle y colaboradores demostraron que, utilizando un modelo murino, un mutante deficiente en la producción de exotoxina A era menos virulento y tenía menor capacidad de diseminación que una cepa salvaje (Fogle et al., 2002). Además, los anticuerpos neutralizantes de esta toxina bloqueaban eficientemente los efectos de ésta, lo que podría representar una terapia alternativa a los tratamientos actuales. Aparte de la inmunización pasiva, la exotoxina A podría ser una buena candidata para la elaboración de vacunas. De hecho la inmunización activa con esta proteína es capaz de conferir hasta un 94% de protección frente a la infección por *P. aeruginosa* en un modelo murino de lesión por quemadura (Manafi et al., 2009).

La piocianina es un metabolito secundario azul secretado como toxina por *P. aeruginosa*. A pH sanguíneo es zwitteriónico lo que le confiere la capacidad de atravesar la membrana plasmática celular. Este compuesto es letal para las células debido a su marcado carácter oxidativo, pero además inhibe la producción de aniones superóxido en los neutrófilos, la diferenciación de los linfocitos, el movimiento ciliar de las células broncoepiteliales y la síntesis de citoquinas en los

macrófagos alveolares. En el caso particular de las lesiones por quemaduras se ha podido detectar la presencia de esta toxina en los exudados de las heridas infectadas y se ha demostrado que induce la senescencia prematura de las células del huésped lo que dificulta y retrasa la reparación de la lesión (Muller et al., 2009).

Sistemas de captura de hierro

Las bacterias necesitan hierro como cofactor para la actividad de varios enzimas vitales. La capacidad de los microorganismos para captar hierro en el huésped es un factor que limita el progreso del proceso infeccioso. Durante la infección, los patógenos compiten con el huésped por el hierro que está asociado a proteínas como la transferrina, la lactoferrina, la ferritina o la hemoglobina. *P. aeruginosa* dispone de varios componentes con capacidad quelante del hierro, conocidos genéricamente como sideróforos, tales como la pioverdina o la pioquelina (Létoffé et al., 1998). En un estudio reciente en el que se estudiaron los genes expresados por *P. aeruginosa* durante la infección de una herida por quemadura se identificó la sobreexpresión de los sistemas de adquisición de hierro, lo que indica su importancia en este proceso (Bielecki et al., 2011).

La pioverdina es un sideróforo fluorescente que está compuesto por tres partes; un cromóforo derivado de 2,3-diamino-6,7-dihydroxiquinolina, un péptido de ocho aminoácidos unidos al grupo carboxilo del cromóforo y un ácido dicarboxílico o una amida dicarboxílica unida al carbono 3 del cromóforo (Demange et al., 1990). Además de captar hierro, la pioverdina está implicada en el control de la formación de biofilm y en la regulación de la expresión de otros factores de virulencia (Lamont et al., 2002). Hasta la fecha se desconoce el mecanismo de secreción de este sideróforo pero se ha identificado al receptor FpvA como responsable de la captación del sideróforo una vez ha quelado el hierro (Schalk et al., 2001).

La pioquelina, que químicamente es ácido (2-o-hidroxifenil-2-tiazolin-4-il)-3-metil-tiazolidina-4-carboxílico, utiliza a FptA como receptor específico presente en la membrana externa para su entrada en la bacteria. Los mutantes deficientes en la expresión de este sideróforo no son capaces de diseminarse desde la piel hacia la sangre u otros órganos en un modelo de infección por quemadura. Como consecuencia, la tasa de mortalidad de los ratones infectados con estos mutantes es menor que la de las cepas parentales (Sokol & Tn, 1987). Probablemente, el efecto de la pioquelina sobre la virulencia de *P. aeruginosa* sólo esté basado en la capacidad de este sideróforo para estimular el crecimiento del microorganismo gracias a la solubilización y captación de hierro.

Alginato

P. aeruginosa es capaz de producir un exopolisacárido o cápsula de alginato. El alginato es un copolímero lineal cargado negativamente con enlaces β -1,4 de ácido D-manurónico y su epímero C-5, ácido L-glucurónico (Linker & Jones, 1966), el cual es sintetizado a partir de un

precursor (ácido guanosina-difosfato manurónico) por los enzimas codificados por los genes *algA*, *algC*, y *algD* (Govan & Deretic, 1996). El precursor es polimerizado y transportado a través de la membrana interna gracias a la acción de los productos de los genes *alg44* y *alg8* (Maharaj et al., 1993), y algunos de los residuos de ácido manurónico son epimerizados a ácido glucurónico gracias a la C5 epimerasa codificada por *algG* (Franklin et al., 1994). Aunque la síntesis del precursor del alginato es bien conocida, existen lagunas en el conocimiento de los procesos de epimerización, modificación y transporte de este polisacárido. Se sabe que los genes *algF*, *algI*, *algJ*, *algK*, *algL* y *algX* participan en la modificación de la membrana externa (Ramsey & Wozniak, 2005). La síntesis de alginato está controlada a nivel transcripcional y post-transcripcional. La expresión del operón biosintético del alginato (*algD*-*algA*) está regulado, principalmente, por el promotor de *algD*. Un elemento clave en la producción de alginato es AlgT, que induce la expresión de *algD* e incrementa la producción de proteínas reguladoras que activan la transcripción de *algD* como son AlgR o AlgB (Martin et al., 1993). Además, AlgT inhibe los productos de los genes *mucA* y *mucB* que tiene un efecto contrario, desregular la expresión de *algT* y sobreproducir alginato. En este sentido, la mayor parte de cepas muy capsuladas o mucoides presentan mutaciones estables en los genes *mucA* o *mucB* (Boucher et al., 1997).

El alginato es el principal factor de virulencia en las infecciones respiratorias crónicas por *P. aeruginosa* (Pedersen et al., 1990). El alginato confiere a la bacteria resistencia frente a la acción de los fagocitos del tracto respiratorio y frente a la opsonización por el complemento o los anticuerpos, además de ser muy poco inmunogénico (Pier et al., 2001). También está implicado en la modulación de la interacción de la bacteria con las células epiteliales y en la inducción de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, mucina y lisozima por parte del epitelio respiratorio (Kishioka et al., 1999).

En contraposición con las infecciones respiratorias crónicas, el alginato no parece ser un factor de virulencia crucial en las infecciones por quemaduras. En este sentido, un mutante deficiente en *algC*, derivado de la cepa PAO1, fue tan virulento como la cepa parental PAO1 en un modelo murino de infección por quemadura (Goldberg et al., 1995).

Polisacárido Psl y Pel

Psl y Pel son exopolisacáridos que actúan como “pegamento molecular”, formando uniones célula-célula y célula-superficie (Ma et al., 2006). Estas moléculas tienen un papel muy importante en la etapa inicial de formación del biofilm y en el mantenimiento del mismo. También se les adjudica un papel protector frente a la fagocitosis por neutrófilos (Mishra et al., 2012) y frente a los antibióticos (Yang et al., 2011). A nivel estructural Psl, que es el más estudiado, se compone de pentasacáridos ramificados, constituidos por monómeros de D-glucosa, D-manosa y L-ramnosa (Byrd et al., 2009).

Ambos polisacáridos han sido identificados tanto en cepas mucoides, como en no mucoides, tomando especial relevancia en estas últimas, debido a su carencia en la producción de alginato (L. Ma et al., 2009). La síntesis de Pel y Psl es un proceso complejo, ya que está codificada en dos operones compuestos por 7 y 12 genes respectivamente, con puntos de control a distintos niveles. Las mutaciones que impiden la síntesis de cualquiera de los dos exopolisacáridos, son compensadas por un incremento de la expresión del otro polímero (Colvin et al., 2012).

- **Lipopolisacárido**

El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente de la membrana externa de *P. aeruginosa* y contribuye a mantener la integridad estructural de ésta. La estructura del LPS de este microorganismo es el típico de una bacteria Gram negativa y está compuesto de lípido A, el núcleo o *core* y el antígeno O (figura 6).

El lípido A es el anclaje hidrofóbico del LPS y su estructura básica contiene diglucosamina bifosfato. El lípido A puede estar pentaacilado, como ocurre en el 75% de las cepas de laboratorio, o hexaacilado, como se da en prácticamente todas las cepas procedentes de pacientes con FQ (Pier, 2007). El núcleo está unido al lípido A por una región relativamente conservada que se denomina núcleo interno y que está compuesto por dos residuos de ácido D-mano-oct-2-ulosónico y dos residuos de L-glicero-D-manosa-heptosa (Bystrova et al., 2003), a menudo fosforilado con un grupo 7-O-carbamil unido al segundo residuo de heptosa. Se ha demostrado que el núcleo interno es esencial para la viabilidad de *P. aeruginosa*, en este sentido una mutación en el gen *waaP*, que fosforila el primer residuo de heptosa es letal para la bacteria (Walsh et al., 2000).

El núcleo externo se sintetiza como dos glicofomas distintas que contienen un residuo de galactosamina unida a una alanina en posición N, tres residuos de D-glucosa y un residuo de L-ramnosa, cuya posición difiere en las dos glicofomas. Solamente una de las dos glicofomas tiene la capacidad de unirse al antígeno O. Los grupos hidroxilo de estos azúcares suelen estar O-acetilados.

Unido al núcleo externo se encuentra el antígeno O que está formado por la repetición de unidades de 3-4 monosacáridos, excepto el serotipo O7 que está compuesto por unidades disacarídicas. Los azúcares que típicamente podemos encontrar formando parte de la cadena O en el LPS de *P. aeruginosa* incluyen derivados de distintos aminoazúcares acilados en posición N junto con ramnosa. El antígeno O permite establecer distintos serotipos atendiendo a los distintos anticuerpos específicos para cada una de las variantes químicas que conforman este polímero. Los aislados de pacientes con infecciones crónicas generalmente no sintetizan cadena O, es decir, presentan un LPS rugoso, en contraposición con las cepas que sintetizan cadena O que presentan un LPS liso.

Introducción

El LPS contribuye a la patogénesis de las infecciones por *P. aeruginosa* y está implicado en la interacción con receptores celulares o componentes humorales del huésped.

El lípido A, por ejemplo, es reconocido por el receptor Toll-like 4 (TLR-4) y por la proteína que une LPS (LPS Binding Protein, LBP). El LPS unido a la LBP es transferido a la proteína de membrana CD14. El LPS también interacciona con los adaptadores MyD88 y TRIF, y con la proteína CFTR presente en las células epiteliales. En general, todas estas interacciones conllevan la activación de factores de transcripción del huésped, habitualmente NF- κ B, con la consiguiente producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α . En su conjunto, estas interacciones modulan la respuesta inflamatoria del huésped por parte de *P. aeruginosa* lo que puede determinar el resultado final del proceso infeccioso (Gerald B Pier, 2007).

Desde hace tiempo se sabe que, en las infecciones agudas causadas por *P. aeruginosa*, la presencia del antígeno O es esencial para la virulencia del microorganismo. Existen numerosas evidencias experimentales en este sentido (Cryz et al., 1984; Ohno et al., 1995), incluyendo los estudios realizados por Goldberg y colaboradores en un modelo murino de infección por quemadura (Goldberg et al., 1995). La importancia del antígeno O del LPS en las infecciones agudas radica en que es necesario para que *P. aeruginosa* pueda diseminarse de forma sistémica dado que confiere resistencia al complemento (Pier et al., 1984). En este sentido las cepas "rugosas" desprovistas de antígeno O son rápidamente eliminadas por la acción del suero y, probablemente sólo pueden existir en áreas donde los niveles de complemento son muy bajos, como sucede en el pulmón de los pacientes con FQ.

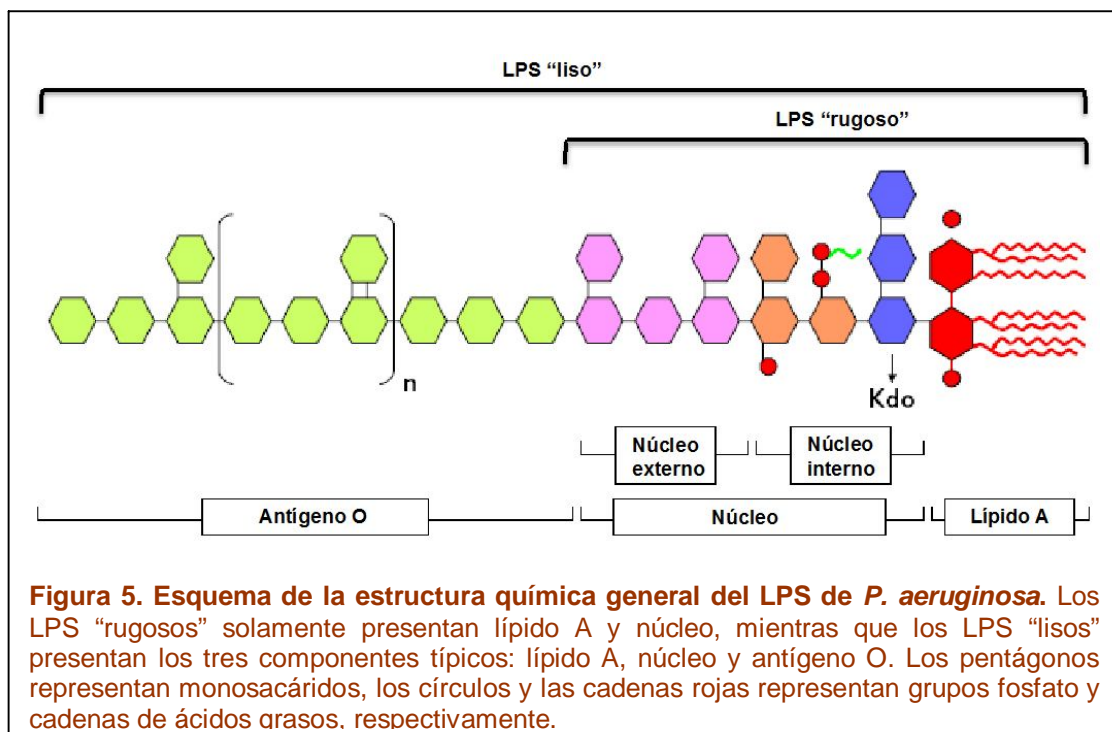


Figura 5. Esquema de la estructura química general del LPS de *P. aeruginosa*. Los LPS "rugosos" solamente presentan lípido A y núcleo, mientras que los LPS "lisos" presentan los tres componentes típicos: lípido A, núcleo y antígeno O. Los pentágonos representan monosacáridos, los círculos y las cadenas rojas representan grupos fosfato y cadenas de ácidos grasos, respectivamente.

Dada la importancia del antígeno O en las infecciones agudas causadas por *P. aeruginosa*, se ha propuesto que este antígeno podría ser un buen candidato para el desarrollo de una vacuna eficaz. En los últimos 40 años se han realizado numerosos intentos para formular una vacuna basada en este antígeno y en todos los casos se ha fracasado debido a su escasa inmunogenicidad y a su elevada toxicidad (Pier, 2007).

- **Quorum sensing**

El quorum sensing es un mecanismo de señalización intercelular que permite a las bacterias coordinar la expresión de genes importantes para la adaptación al ambiente cuando la densidad de la población bacteriana alcanza un cierto grado. En las bacterias Gram negativas la señalización es llevada a cabo por pequeñas moléculas que son capaces de difundir a través de la membrana bacteriana y controlar la expresión de determinados genes. A estas moléculas se les denomina autoinductores. En *P. aeruginosa* se conocen tres sistemas de quorum sensing (para una revisión exhaustiva ver: (Rumbaugh et al., 2000; Rutherford & Bassler, 2012). El sistema *las*, en el que el autoinductor es la N-3-(oxododecanoil)-L-homoserina lactona, el sistema *rhl*, en el que el inductor es la N-butiril-L-homoserina-lactona, y el sistema PQS cuyo autoinductor es la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona. Cuando las moléculas autoinductoras se acumulan, éstas se unen a sus respectivos activadores transcripcionales, *lasR*, *rhlR* y *pqsR*. Los sistemas de quorum sensing de *P. aeruginosa* controlan la expresión de más de 100 genes distintos, varios de ellos implicados en la virulencia de este patógeno. Entre ellos se incluyen los genes *lasA*, *lasB*, que codifican para las elastasas, el *toxA* que codifica la exotoxina A, los genes *rhlAB* y *aprA*, implicados en la síntesis de ramnolípidos y la fosfatasa alcalina, respectivamente, y los genes que codifican para la piocianina y la pioverdina, entre otros.

Se ha estudiado la contribución de los sistemas quorum sensing en la virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo de ratón con infección por quemadura (Rumbaugh et al., 1999). Para ello se utilizaron mutantes derivados de PAO1 deficientes en distintos componentes de los sistemas *las* y *rhl*. Se determinó la mortalidad que causaban y la capacidad de diseminación sistémica y local de cada uno de ellos. En comparación con la cepa parental, todos los mutantes en algún componente de los dos sistemas quorum sensing exhibieron una menor mortalidad. Además, la capacidad de diseminación fue significativamente menor en los mutantes comparados con la cepa parental. En su conjunto estos resultados indican que los sistemas de quorum sensing contribuyen a la virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo murino de infección por quemadura facilitando la diseminación local en la piel lesionada en los primeros momentos de la infección y la diseminación sistémica tardía. A pesar de ello no se conocen qué genes concretos, de todos los controlados por los sistemas de quorum sensing, están implicados en los efectos observados en los ratones y es probable que sea el efecto combinado de todos ellos.

▪ Flagelo

P. aeruginosa presenta un único flagelo polar con la estructura típica presente en otros patógenos Gram negativos (Samatey et al., 2001). El flagelo está compuesto por un cuerpo basal, con un anillo L unido a la membrana externa, un anillo P asociado al peptidoglicano y los anillos M y S, inmerso y unido a la membrana plasmática, respectivamente. El cuerpo basal está unido al motor, responsable del movimiento rotatorio en el sentido de las agujas del reloj del filamento, lo que origina el movimiento de la bacteria. La parte externa del flagelo está formado por un gancho y un filamento formado por la proteína FliC. El filamento termina con la proteína FliD. La mayoría de los aislados de *P. aeruginosa* expresan uno o dos tipos de flagelo (a o b) cuya diferencia estriba en la secuencia de aminoácidos del filamento codificado por el gen *fliC* (Allison et al., 1985).

La síntesis del flagelo es un proceso complejo en el que están implicados más de 40 genes distintos agrupados en tres regiones no continuas del cromosoma de *P. aeruginosa*. Estos genes se expresan habitualmente durante el crecimiento plactónico y su expresión suele estar asociada a las primeras fases del proceso infeccioso. De hecho, la mayoría de aislados procedentes de infecciones agudas son móviles y presentan flagelo, mientras que el 39% de los aislados de *P. aeruginosa* procedentes de infecciones crónicas no suelen presentar flagelo (Mahenthiralingam et al., 1994).

El flagelo está implicado en las fases iniciales de la infección respiratoria y activa la producción de IL-6 y IL-8, vía NF- κ B, gracias a su unión con TLR-2, TLR-5 y asialoGM1 presentes en la superficie de las células epiteliales del tracto respiratorio (Adamo et al., 2004). Recientemente se ha demostrado que el flagelo también está implicado en la resistencia frente a la acción lítica de las proteínas surfactantes del pulmón. La ausencia de un flagelo estructuralmente completo podría alterar la integridad de la membrana externa siendo el microorganismo más susceptible a las proteínas surfactantes (Zhang et al., 2007).

El flagelo es un factor de virulencia clave en las infecciones de quemaduras por *P. aeruginosa*. Los estudios realizados, hace ya casi 25 años, con mutantes desprovistos de flagelo demostraron que la ausencia de este elemento móvil reducía la virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo de ratón quemado. Además, los mutantes desprovistos de flagelo presentaban una menor capacidad de diseminación sistémica y de causar bacteremia (D. Drake & Montie, 1988). Los resultados de estos estudios se vieron apoyados, de forma indirecta, por estudios posteriores en los que se vio que el uso de anticuerpos monoclonales anti-flagelares protegía a los ratones quemados de las infecciones por *P. aeruginosa* (Ochi et al., 1991).

▪ Biofilm

Un biofilm se puede definir como una comunidad estructurada de microorganismos, embebidos en una matriz de polímeros extracelulares, adherida a una superficie. Los biofilms pueden

comprender a una sola especie microbiana o a varias y pueden adherirse a una gran variedad de superficies bióticas o abióticas.

El desarrollo de un biofilm es un proceso complejo y bien coordinado, gracias a la captación de señales ambientales y a la comunicación intercelular (quorum sensing). Dicho proceso comprende las etapas de iniciación, maduración, mantenimiento y disolución del biofilm. Una de las señales que puede desencadenar la formación de un biofilm es la abundancia de nutrientes. Cuando se da esta circunstancia, una o pocas bacterias planctónicas (nadadoras de vida libre), se acercan a una superficie y sufren una serie de cambios que conducen a la reducción de su movilidad y a la adherencia sobre el sustrato. En el caso de *P. aeruginosa*, en el proceso de adhesión intervienen el flagelo y el pili tipo IV (O'Toole & Kolter, 1998). El biofilm puede continuar su proceso de maduración y mantenimiento mientras se prolonga el aporte de nutrientes, pero cuando éstos empiezan a escasear, puede producirse la separación de algunas bacterias del biofilm y su regreso a la vida planctónica (Kolter et al., 1993). Otras señales ambientales que pueden influenciar en el desarrollo de un biofilm son: temperatura, osmolaridad, pH, cantidad de hierro disponible, oxígeno y densidad poblacional (Stanley, 1983).

En el proceso de formación del biofilm, *P. aeruginosa* sufre una serie de cambios (Sauer et al., 2002), entre los que se destacan: la reducción de la expresión de genes relacionados con el flagelo (Wang et al., 2014), incremento de la producción de alginato (Davies et al., 1993), retardo del crecimiento y expresión de bombas de expulsión de antibióticos (Whiteley et al., 2001).

La formación de estas películas biológicas confiere ventajas a los individuos que la integran, por lo que son consideradas como una estrategia para la supervivencia bacteriana. En el medio ambiente, la formación de biofilms aporta a *P. aeruginosa* protección frente a la luz UV, la exposición a ácidos, la toxicidad de metales o la deshidratación. En las infecciones, los biofilms ofrecen resistencia a la infiltración de células polimorfonucleares, así como a la opsonización por el complemento o inmunoglobulinas, y a los antibióticos (Mah et al., 2003). Además las bacterias presentes en el interior del biofilm, expresan menos factores de virulencia debido a su estado estacionario de crecimiento (Waite et al., 2005) y a la regulación por quorum sensing (Rampioni et al., 2009), lo que dificulta su reconocimiento por parte del sistema inmune del huésped, facilitando la persistencia de los microorganismos en la infección.

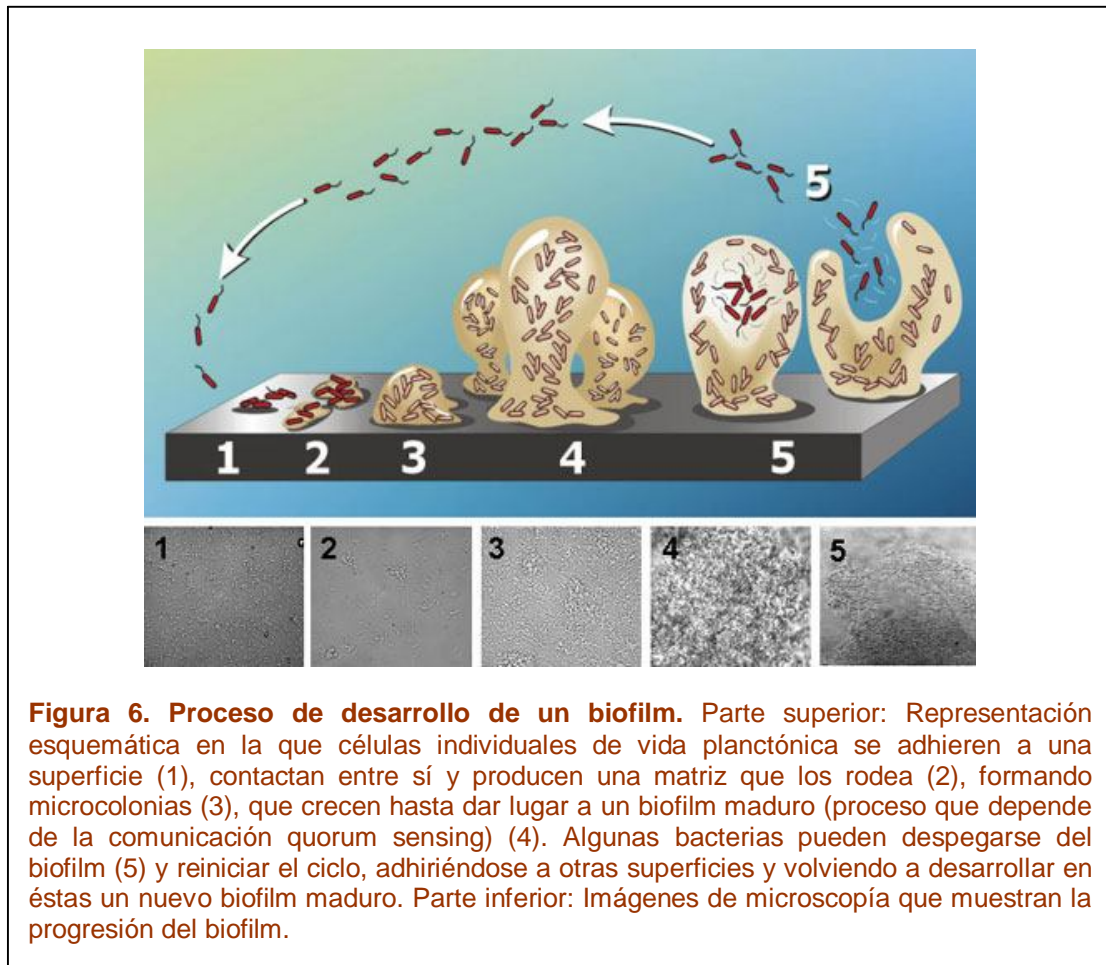


Figura 6. Proceso de desarrollo de un biofilm. Parte superior: Representación esquemática en la que células individuales de vida planctónica se adhieren a una superficie (1), contactan entre sí y producen una matriz que los rodea (2), formando microcolonias (3), que crecen hasta dar lugar a un biofilm maduro (proceso que depende de la comunicación quorum sensing) (4). Algunas bacterias pueden desprenderse del biofilm (5) y reiniciar el ciclo, adhiriéndose a otras superficies y volviendo a desarrollar en éstas un nuevo biofilm maduro. Parte inferior: Imágenes de microscopía que muestran la progresión del biofilm.

2.2 La piel

El cuerpo humano presenta un excelente diseño que impide el ataque de los microorganismos, por un lado está dotado de una gruesa “armadura” protectora y por otro, de un sistema inmunitario eficiente, pero cuando éstos se deterioran, aparecen las infecciones. Como ya se ha comentado, *P. aeruginosa* es incapaz de atravesar las defensas cutáneas por sí misma, pero se encuentra estratégicamente situada, esperando a que esta barrera sea ineficiente o se vea comprometida, para causar una infección (Greene et al., 1984; Sangeorzan et al., 1990; Silvestre & Betloch, 1999). Alteraciones en las defensas determinan la susceptibilidad de los pacientes a una infección. *P. aeruginosa*, al ser una bacteria ubicua y estar presente en el agua, superficie corporal e instrumental clínico, puede “saltar” desde el ambiente directamente a tejidos internos cuando se produce una lesión en la piel. Por ello, cuando en el ámbito hospitalario debe realizarse una práctica invasiva se incrementa el riesgo de infección.

La piel cubre la superficie externa del cuerpo y es el órgano más grande, tanto en superficie como en peso. En un adulto la piel tiene una superficie de unos 2m² y un peso de unos 5kg. Su espesor varía entre los 0,5mm en los párpados hasta los 4mm en el talón.

2.2.1 Funciones de la piel

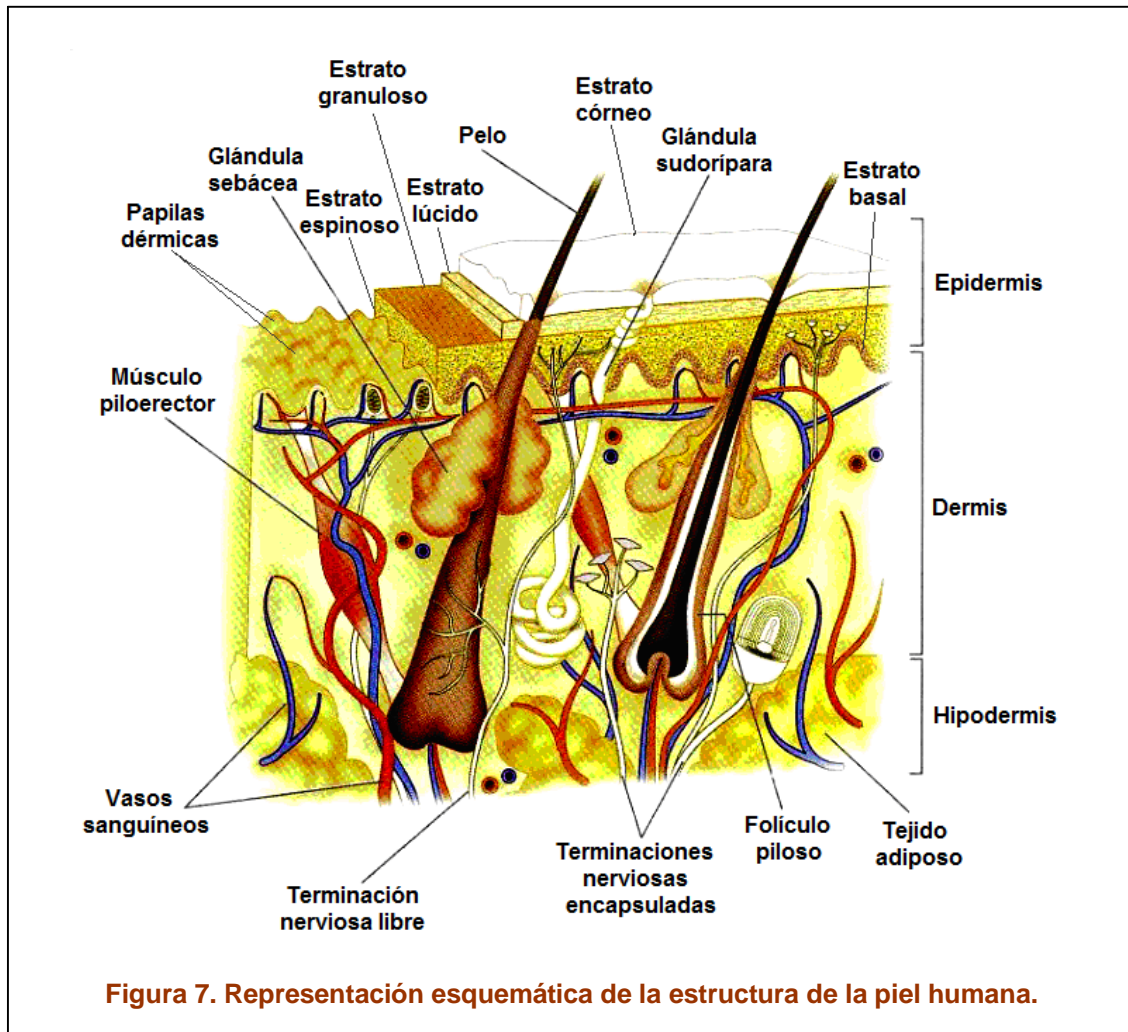
La piel desempeña cinco funciones importantes que contribuyen a la supervivencia del individuo: protege, regula la temperatura, actúa como órgano sensorial, excreta sustancias de desecho y sintetiza vitamina D. En esta introducción nos centramos en la función protectora de la piel frente a las infecciones microbianas.

La piel es considerada la primera línea de defensa contra una multitud de peligros. Sus características estructurales permiten la protección diaria contra la infección por microbios patógenos. Las células del estrato córneo, llenas de queratina, impiden también la entrada de sustancias químicas nocivas y proporcionan protección frente a desgarros y cortes. La queratina, al ser impermeable, también evita la pérdida excesiva de líquidos. Y la presencia de melanina protege frente a los rayos UV de la luz solar.

2.2.2 Estructura

La piel consta de dos partes principales, la porción superficial, más delgada, está compuesta por tejido epitelial y se denomina epidermis. La parte profunda y más gruesa de tejido conectivo es la dermis. La epidermis es avascular, mientras que la dermis está vascularizada (figura 7).

La dermis se apoya sobre una capa gruesa de tejido conjuntivo laxo y graso, llamada tejido subcutáneo o hipodermis, que no forma parte de la piel. Las fibras que se extienden desde la dermis fijan la piel al tejido subcutáneo, el cual a su vez se adhiere a la fascia subyacente. La grasa del tejido subcutáneo aísla el cuerpo frente a temperaturas extremas (frío o calor). También actúa como fuente de energía almacenada y como almohadilla amortiguadora, que protegen a los tejidos subyacentes del daño causado por traumatismos.



▪ Epidermis

La epidermis está compuesta por un epitelio pavimentoso estratificado queratinizado. Contiene cuatro tipos principales de células: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Alrededor del 90% de las células epidérmicas son queratinocitos, que se distribuyen en varias capas o estratos según su estadio de desarrollo (estrato basal, espinoso, lúcido y córneo) (figura 8) y producen la proteína queratina. Ésta es una proteína fibrosa y resistente, que protege a los tejidos subyacentes de las abrasiones, el calor, los microorganismos y los compuestos químicos.

Estrato basal

La capa más profunda de la epidermis es el estrato basal o estrato germinativo, compuesto por una sola hilera de queratinocitos cúbicos o cilíndricos. Algunas células de esta capa son células madre que se dividen de forma continua para formar nuevos queratinocitos. El citoesqueleto de

Las células del estrato basal están formadas por filamentos intermedios dispersos de queratina, que se adhieren a los desmosomas, y su función es mantener unidas las células del estrato basal entre sí y a las células del estrato espinoso suprayacente. Otra función de los filamentos de queratina es adherirse a los hemidesmosomas y conectar los queratinocitos del estrato germinativo a la membrana basal subyacente, dispuesta entre la epidermis y la dermis.

Estrato espinoso

Se encuentra situado sobre el estrato basal y presenta un grosor de unas 8 a 10 filas de queratinocitos apilados. Los queratinocitos del estrato espinoso, se generan a partir de las células madre de la capa basal, por lo que presentan los mismos orgánulos que las células de dicha capa y conservan la capacidad de dividirse. Estas células producen haces más gruesos de queratina. Estos filamentos intermedios de queratina se insertan en los desmosomas que unen a las células entre sí de manera firme. Esta disposición otorga fuerza y flexibilidad a la piel.

Estrato granuloso

Se encuentra en la parte intermedia de la epidermis. Está formado por entre tres y cinco capas de queratinocitos aplanados que experimentan apoptosis. Los núcleos y otros orgánulos de estas células comienzan a degenerar a medida que se alejan de su fuente de nutrientes (vasos sanguíneos dérmicos). Estas células liberan una secreción rica en lípidos, que ocupa los espacios entre las células del estrato granuloso, el estrato lúcido y el córneo. Esta secreción actúa como un sellador hidrófobo, que evita tanto la entrada como la salida de agua y el ingreso de materiales extraños. Los núcleos de estas células se fragmentan y mueren, por lo que este estrato señala la transición, desde el punto de vista metabólico, entre la capa profunda activa, y las capas más superficiales de células muertas.

Estrato lúcido

Sólo está presente en la piel gruesa de la yema de los dedos, las palmas de las manos y las plantas de los pies. Consiste en cuatro o seis capas de queratinocitos muertos que contienen grandes cantidades de queratina.

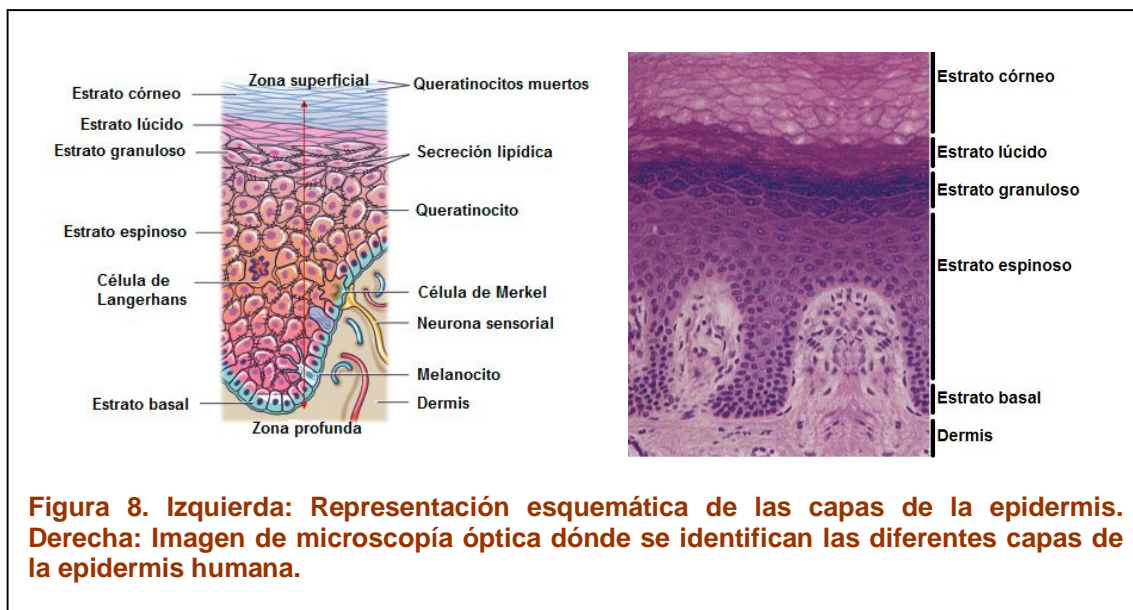
Estrato córneo

Estrato compuesto por un promedio de unas 25 a 30 capas de queratinocitos muertos aplanados, el número de capas es variable en función de la región corporal. Las células de esta capa se mantienen fuertemente unidas gracias a la gran superposición de unas células con otras y a que las membranas adquieren una morfología ondulada, encajando unas con otras como las piezas de un rompecabezas. Estas capas de células muertas aportan protección frente a lesiones e invasión microbiana a las capas más profundas. En este estrato las células

se descaman de forma continua y se reemplazan por células procedentes de estratos más profundos.

▪ Dermis

La dermis es la porción más profunda de la piel. Su espesor varía en función de la región corporal y está formada sobre todo por tejido conectivo denso irregular con colágeno y fibras elásticas. Las fibras colágenas o blancas son fuertes y resistentes, mientras que las fibras elásticas o amarillas, confieren elasticidad y flexibilidad. Las pocas células halladas en la dermis suelen ser fibroblastos, algunos macrófagos y pocos adipocitos, cerca de su unión con el tejido subcutáneo. Los nervios, los folículos pilosos y los vasos sanguíneos se encuentran en esta capa, por lo que se considera fundamental para la supervivencia de la epidermis.



Estructuralmente la dermis puede dividirse en una región papilar superficial delgada y una región reticular gruesa más profunda.

La región papilar representa alrededor de la quinta parte del espesor total de la capa. Se caracteriza por hileras paralelas de proyecciones llamadas papilas dérmicas. Estas proyecciones ascendentes forman parte de la unión dermoepidérmica y además son las responsables de las crestas y surcos de las huellas dactilares. Este patrón de crestas se forma antes del nacimiento, es único para cada individuo y además se mantiene constante a lo largo de la vida. Esta región presenta fibras de colágeno y elastina, además de contener algunos capilares y terminaciones nerviosas.

La región reticular es la capa más profunda de la piel. Está compuesta de fibras de colágeno gruesas, fibroblastos dispersos y células circulantes como macrófagos. Las fibras de colágeno se entrelazan formando una red, que confiere resistencia a la piel, aunque también hay, en

menor proporción, fibras elásticas que confieren elasticidad y flexibilidad. Estas fibras elásticas disminuyen con el envejecimiento, provocando la aparición de arrugas en la piel. Los vasos sanguíneos, los nervios, los folículos pilosos, las fibras musculares y las glándulas sebáceas y sudoríparas ocupan los espacios entre las fibras.

2.2.3 Defensas de la epidermis

Al hablar de las defensas de la epidermis, no sólo se hace referencia a la función de barrera física que ésta ejerce, sino que existen otros mecanismos por los cuales la epidermis separa y protege el medio interno del medio externo. Por un lado las glándulas sudoríparas acidifican la piel, por otro lado, la microbiota impide la colonización de los patógenos, los lípidos cutáneos poseen un efecto bactericida y las células presentes en la epidermis sirven de conexión con el sistema inmune.

- **Defensas aportadas por las glándulas sudoríparas**

Existen dos tipos de glándulas sudoríparas, las ecrinas, implicadas en la termorregulación, y las apocrinas, encargadas de la lubricación del pelo y la piel. Las glándulas ecrinas son las responsables de la secreción del sudor, compuesto en su mayoría por agua, que cuando se evapora disminuye la temperatura corporal; pero además de agua, el sudor contiene sales y electrolitos, que acidifican la superficie de la piel. El resultado de este proceso es la obtención de una barrera fría, seca y ligeramente ácida. Además, las glándulas ecrinas expresan de forma constitutiva varios péptidos antimicrobianos, como la catelicidina y las β -defensinas (Murakami et al., 2002). Este hecho genera distintos microambientes en las diferentes regiones corporales, que limitan la colonización microbiana.

- **Defensas aportadas por la microbiota**

Todos los individuos presentamos sobre la piel una determinada microbiota, bacterias que viven sobre la superficie corporal y que en condiciones normales no suponen un riesgo para nuestra salud. La microbiota de la piel contribuye a la inmunidad del huésped impidiendo el crecimiento de microbios patógenos, tanto de forma directa como indirecta. Indirectamente, la presencia de microbios comensales en la piel, supone una competición por los nutrientes y por el espacio. Adicionalmente, se sabe que hay bacterias que inhiben activamente el crecimiento de los competidores mediante la producción de compuestos antimicrobianos. Estos compuestos llamados bacteriocinas son capaces de inhibir el crecimiento de especies próximas a la bacteria que las produce, sin tener ningún efecto sobre esta última. Un ejemplo lo constituye *Staphylococcus epidermidis*, que mediante la producción de serin-proteasas, evita que *Staphylococcus aureus* infecte las células del huésped y forme un biofilm. Dichas proteasas degradan proteínas bacterianas implicadas en la formación del biofilm y receptores proteicos humanos necesarios para que *S. aureus* infecte las células huésped (Sugimoto et al.,

2013). Otros compuestos producidos por *S. epidermidis*, actúan conjuntamente con péptidos antimicrobianos producidos por el huésped, eliminando de forma selectiva *Streptococcus pyogenes* y *S. aureus* (Cogen et al., 2010).

▪ Defensas aportadas por los lípidos cutáneos

En el estrato córneo se producen lípidos (ceramidas, colesterol y ácidos grasos saturados) que impermeabilizan la piel. La grasa cutánea presenta diversas funciones, por un lado, aporta vitamina E a la superficie de la piel como agente antioxidante, y por el otro, los triglicéridos liberan ácidos grasos que tienen un potente efecto antimicrobiano, como el ácido láurico (C12:0), el ácido sapiénico (C16:1Δ6) u otros ácidos grasos más pequeños (C7-C11), que proporcionan protección frente a ciertos hongos (Drake et al., 2008; Ferguson & Rothman, 1956). Los ácidos láurico y sapiénico tienen efectividad contra bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*. Se especula que la aplicación exógena de estos lípidos podría suponer una nueva opción terapéutica, o servir de profilaxis para personas con riesgo de infección (Fischer et al., 2013).

▪ Defensas aportadas por las células

Los tres tipos principales de células que podemos encontrar en la epidermis son los queratinocitos, las células de Langerhans y los melanocitos.

Queratinocitos

Los queratinocitos son considerados células efectoras pro-inflamatorias, que están estratégicamente posicionadas en la capa más externa del cuerpo, para reaccionar rápidamente frente a agresiones dañinas, mediante la producción coordinada de péptidos antimicrobianos, citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas. Los queratinocitos actúan como sensores del daño, a través de receptores superficiales, los receptores tipo Toll (TLR) son los más estudiados, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño endógeno (DAMPs). Los queratinocitos de la epidermis expresan diferentes tipos de TLRs, localizados en la superficie celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6) y en los endosomas (TLR3 y TLR9). Y cada tipo de receptor reconoce específicamente un PAMP, por ejemplo, el TLR4 reconoce el LPS, los dímeros TLR1-TLR2 y TLR2-TLR6 son estimulados por las lipoproteínas bacterianas y fúngicas, TLR5 reconoce la flagelina, TLR3 reconoce el ARN de doble cadena, mientras que el TLR7 reconoce el de cadena sencilla (Miller & Modlin, 2007). La interacción de los ligandos con sus receptores supone la activación de cascadas de señalización intercelular, que producen respuestas inmunes innatas y adaptativas, con liberación de citoquinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (Miller & Modlin, 2007; Nestle et al., 2009).

Los queratinocitos, mediante la producción de citoquinas, modulan la respuesta inmune del huésped por atracción de diferentes tipos celulares a la piel. Por ejemplo, los queratinocitos activados expresan el ligando 20 de las CC-quimiocinas (CCL20), que atraen de forma selectiva las células T efectoras a la piel, proceso que ocurre en enfermedades como la psoriasis, que se caracteriza por una infiltración exagerada de éstas en la piel. Los queratinocitos activados también pueden reclutar neutrófilos a la epidermis inflamada por producción de CXCL1 y CXCL8 (también conocido como IL-8) (Albanesi et al., 2005).

Otra función de los queratinocitos es la de actuar como células no profesionales presentadoras de antígeno, ya que se han identificado en su superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) (Nickoloff & Turka, 1994).

Células de Langerhans

Las células de Langerhans son las principales células dendríticas epidérmicas. Fueron descritas en 1868 por Paul Langerhans, considerándose parte del sistema nervioso. Posteriormente, se catalogaron como grandes macrófagos, y en la actualidad se sabe que son células dendríticas que intervienen en la inmunovigilancia de la piel. Las células de Langerhans se caracterizan por presentar un tipo específico de orgánulos citoplasmáticos conocidos como gránulos de Birdeck. Estas células derivan de la médula ósea, representan entre un 3 y un 4% del total de células epidérmicas y se encuentran distribuidas de forma regular entre los queratinocitos epidérmicos.

Las células de Langerhans son uno de los primeros tipos celulares en entrar en contacto con los antígenos microbianos. Dichas células captan y procesan los antígenos para exponerlos en su superficie sobre moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. A continuación las células aumentan de tamaño, migran a través de la dermis y entran en los vasos linfáticos dérmicos, por donde circulan hasta alcanzar los ganglios linfáticos, donde presentan los antígenos a las células T efectoras, induciendo preferentemente la diferenciación de las células TH₂ (Dermal et al., 2008; Stoitzner et al., 2002).

Melanocitos

Los melanocitos son otro tipo de células dendríticas epidérmicas, cuya principal función es la producción de melanina que bloquea los rayos UV del sol. En situaciones normales los melanocitos se disponen a nivel de la capa basal epidérmica y contactan con los queratinocitos por medio de sus dendritas, existiendo un melanocito por cada 36-40 queratinocitos (unidad melánica epidérmica) o un melanocito por cada 9 células basales. El color de la piel va a depender de la cantidad de melanocitos (variable en función de la región anatómica), la actividad enzimática de síntesis de melanina y la capacidad de los melanocitos de transferir el pigmento al citoplasma de los queratinocitos.

2.2.4 Uniones celulares

La función protectora que ejerce la piel en su conjunto se debe en gran medida a las uniones que se establecen a nivel celular. Los queratinocitos epidérmicos poseen un programa de diferenciación bien definido que conlleva la expresión de proteínas estructurales cuya función es el anclaje entre las membranas plasmáticas de células adyacentes y la matriz extracelular que la rodea. Tal como se observa en la figura 9, existen 5 tipos distintos de uniones intercelulares.

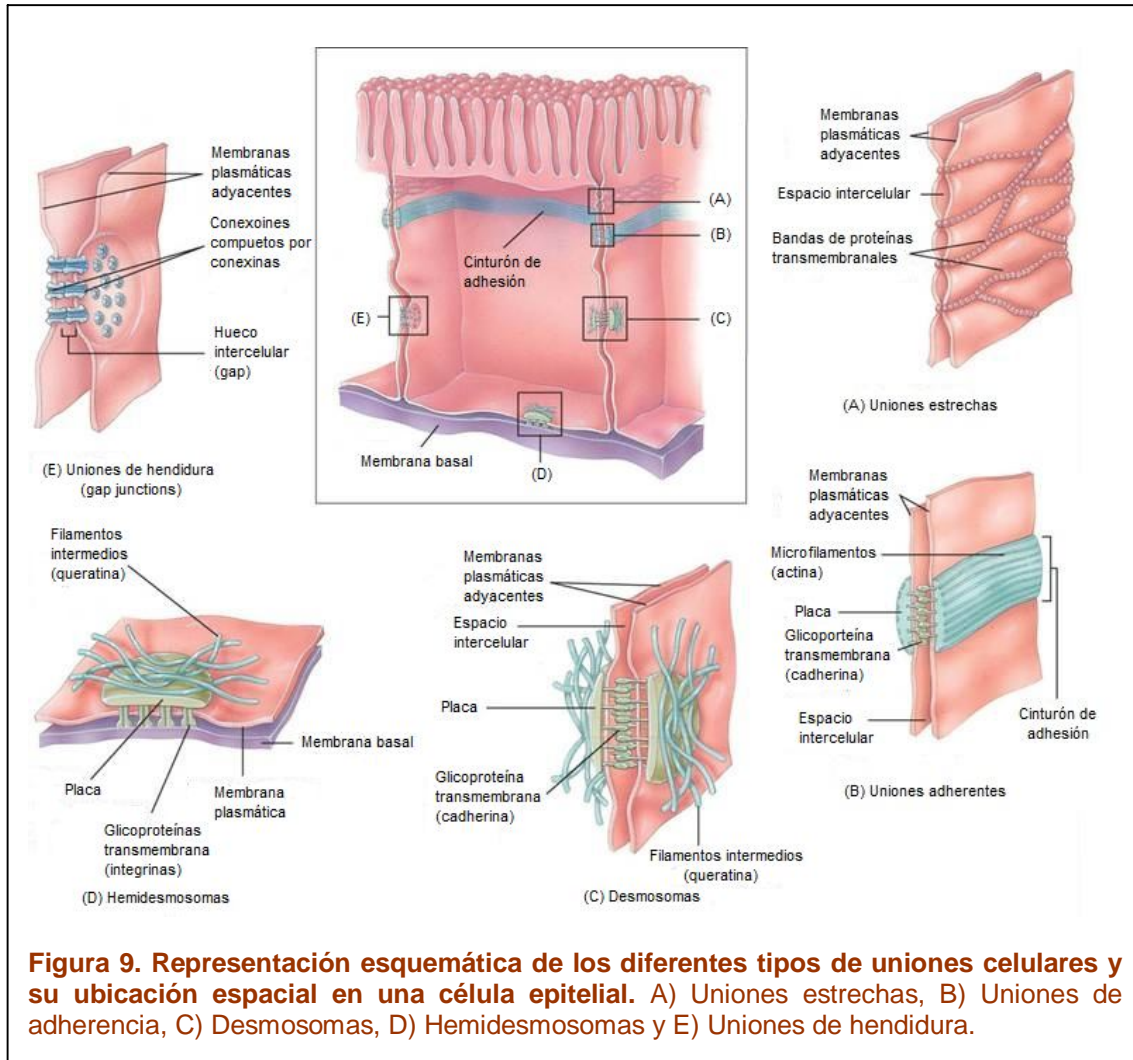


Figura 9. Representación esquemática de los diferentes tipos de uniones celulares y su ubicación espacial en una célula epitelial. A) Uniones estrechas, B) Uniones de adherencia, C) Desmosomas, D) Hemidesmosomas y E) Uniones de hendidura.

▪ Uniones ocluyentes o uniones estrechas

Las uniones estrechas se definen como pequeñas regiones subapicales de contacto directo entre la membrana plasmática de dos células adyacentes sin huecos extracelulares o material intermembranoso (figura 10) (Brandner et al., 2002; Langbein et al., 2002). Estos puntos de contacto directo entre membranas forman en los laterales celulares unas hebras o líneas de unión, generando en conjunto una barrera prácticamente hermética que bordea las células. Las uniones estrechas representan la principal barrera en la vía de transporte paracelular y de

hecho, la función más importante que desempeñan es el control del transporte de solutos, líquidos y células inflamatorias a través de esta vía. Además, estas uniones impiden el movimiento libre de los lípidos en la membrana plasmática dotando a las células de polaridad, diferenciándose en ella una porción apical y otra basal (Aijaz et al., 2006). Inicialmente se creía que estas uniones eran estructuras rígidas e inalterables, pero actualmente se tienen evidencias de que dichas estructuras presentan plasticidad y capacidad de respuesta frente a distintos estímulos, lo que sugiere que el flujo a través del espacio paracelular está regulado.

Además de las funciones ya mencionadas, las proteínas que constituyen las uniones estrechas, ya sea de forma individual o formando complejos, están implicadas en otras funciones, como el transporte vesicular, la transducción de señales, y la diferenciación y proliferación celular. Su función precisa viene determinada por la composición proteica de las uniones, la cual depende a su vez del tipo celular y su diferenciación, así como de estímulos fisiológicos o patológicos.

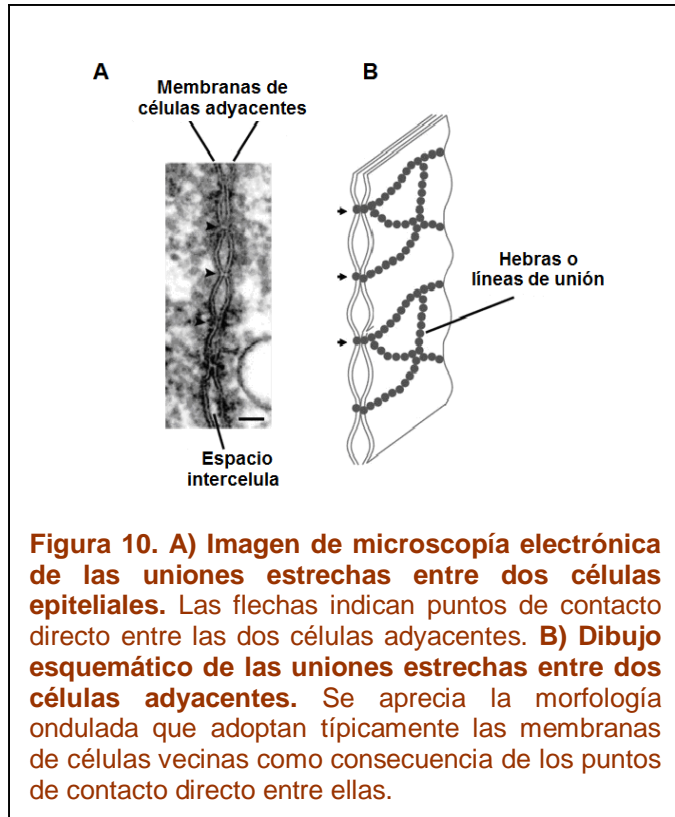


Figura 10. A) Imagen de microscopía electrónica de las uniones estrechas entre dos células epiteliales. Las flechas indican puntos de contacto directo entre las dos células adyacentes. **B) Dibujo esquemático de las uniones estrechas entre dos células adyacentes.** Se aprecia la morfología ondulada que adoptan típicamente las membranas de células vecinas como consecuencia de los puntos de contacto directo entre ellas.

- **Uniones de adherencia o uniones intermedias**

Se caracterizan por la formación de placas densas entre las membranas de dos células adyacentes. Estas placas suelen estar ubicadas próximas a las uniones estrechas y rodean la célula dando lugar a la formación de los llamados cinturones de adhesión. Estas placas están compuestas por glicoproteínas transmembranales, principalmente cadherina, que conectan con los microfilamentos de actina del citoesqueleto, formando uniones fuertes entre células vecinas. Este tipo de uniones confiere resistencia frente a la contracción del epitelio.

- **Desmosomas**

Su nombre proviene del griego “desmós”, que significa unión o vínculo y “soma”, que significa cuerpo. Son una clase de uniones focales que, al igual que las uniones de adherencia, contienen una placa de glicoproteínas, que en el interior de la célula se une a filamentos de queratina. La placa de glicoproteínas se compone básicamente de desmogleína y desmocolina,

que son homólogas de la cadherina. En presencia de Ca^{2+} , las regiones extracelulares de la desmogleína y la desmocolina se unen a moléculas idénticas enfrentadas, pertenecientes a células contiguas, formándose una cremallera cadherínica intercelular. Las regiones citoplasmáticas de la desmogleína y la desmocolina interaccionan con la placoglobina y la desmoplaquina, que intervienen en el armado del desmosoma y en la fijación de los filamentos intermedios. Estas uniones son puntuales y no forman una estructura continua alrededor de la célula, como sí lo hacen las uniones de adherencia, junto con las cuales son responsables de la mayor parte de la fuerza adhesiva de un epitelio polarizado. Este tipo de unión confiere estabilidad a los tejidos sometidos a presión y tensión, como la epidermis o el miocardio.

- **Hemidesmosomas**

Los hemidesmosomas son uniones focales que unen células epiteliales a la matriz extracelular que conforma la lámina basal. Las proteínas implicadas en este tipo de uniones son las integrinas. Estas proteínas transmembranales se unen mediante su dominio extracelular a las proteínas de la lámina basal, mientras que, mediante la región intracelular, conectan con filamentos de queratina. Estas estructuras se encuentran distribuidas en el tejido epitelial y ayudan a resistir las fuerzas ejercidas sobre él.

- **Uniones de hendidura (gap junctions)**

- 1) Las uniones tipo gap o uniones comunicantes funcionan como túneles llenos de líquido que permiten el transporte de iones y moléculas pequeñas de alrededor de 1000Da entre células vecinas. Se componen de proteínas transmembranales llamadas conexinas, que se unen para formar complejos denominados conexones. El intercambio de moléculas e iones permite un acoplamiento químico y eléctrico, por lo que este tipo de uniones son importantes en células que se activan por impulsos eléctricos, y suelen encontrarse en tejidos avasculares como el cristalino y la córnea del ojo.

2.2.5 Composición de las uniones estrechas

Estas uniones se componen de múltiples proteínas transmembranales de la familia de las claudinas, las ocludinas y las moléculas de adhesión (JAM), que se conectan con los filamentos de actina del citoesqueleto a través de un complejo de unión. Dicho complejo comprende proteínas citoplasmáticas asociadas a membrana como ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (p130), que actúan como intermediarios en esta interacción (Schneeberger & Lynch, 2004). También participan proteínas que, aunque no pertenecen propiamente al complejo, intervienen en la regulación de la permeabilidad de las uniones estrechas, como la cingulina, Rab13, Rho y Ras (Fasano & Nataro, 2004).

- **Proteínas transmembranales**

Claudinas

Las claudinas son una familia que engloba un mínimo de 24 proteínas diferentes, de las que se cree que cada una posee unas propiedades de permeabilidad selectivas. El peso molecular de estas proteínas oscila entre 20 y 27kDa. Las claudinas son proteínas que poseen 4 dominios transmembranales que, por su región extracelular, conectan con las claudinas de la célula vecina, mientras que por su región intracelular, donde se encuentra el extremo carboxílico, se establece la interacción con ZO-1/2 y a través de éstas, la unión al citoesqueleto.

La claudina 2 y la 16 adquieren estructuras un tanto distintas que tienen la capacidad de formar canales acuosos extracelulares para el paso paracelular de iones y otras moléculas pequeñas.

Las claudinas se consideran uno de los componentes más importantes de las uniones estrechas. En este sentido, la fosforilación de la claudina 4 marca el inicio de la formación de este tipo de uniones intercelulares y las perturbaciones en la enzima responsable de la fosforilación supone la imposibilidad de establecer uniones estrechas (Aono & Hirai, 2008).

JAM (Proteínas de membrana asociadas a unión)

El nombre de estas proteínas proviene del acrónimo formado por las iniciales del término en inglés Junction-Associated Membrane Proteins, su traducción al castellano sería “proteínas de membrana asociadas a unión”. Estas proteínas tienen un peso molecular de 40kDa y pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Poseen un único dominio transmembranal, y en la porción extracelular presentan dos dominios con puentes disulfuro intracatenarios. Por el momento no se han identificado uniones estrechas formadas exclusivamente por proteínas JAM, pero sí se han observado uniones estrechas cuando se asocian con claudinas.

Ocludina

Es una proteína de 65kDa y fue la primera proteína descubierta en las uniones estrechas. La ocludina se compone de cuatro dominios transmembranales, dos dominios extracelulares y una larga cola en el extremo carboxi terminal ubicada en el citoplasma. Esta cola interacciona con el citoesqueleto a través de ZO-1 y ZO-3. La forma fosforilada es la que se encuentra con más frecuencia localizada en las uniones estrechas, mientras que las formas menos fosforiladas se ubican en la membrana baso-lateral y en el citosol. Aunque se encuentra formando parte de la mayoría de uniones estrechas, su presencia no es esencial, puesto que hay células epiteliales que no expresan ocludina e igualmente desarrollan uniones estrechas funcionales (Saitou et al., 1997).

Proteínas del complejo de unión o Zona Occludens (ZO)

ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (p130) son proteínas citosólicas que sirven de puente entre las proteínas transmembranales de las uniones estrechas y las proteínas del citoesqueleto. ZO-1, la más estudiada, es una proteína de aproximadamente 220kDa que se localiza en la inmediata proximidad de las uniones estrechas, tanto en el epitelio como en el endotelio. La interacción entre ZO-1 y la actina del citoesqueleto se da a través de una proteína intermediaria, la fodrina (Tsukamoto & Nigam, 1997). Otras proteínas que conectan con ZO-1 son ZO-2 y ZO-3, cuyo peso molecular es de 160 y 100kDa, respectivamente. El análisis de las secuencias de estas tres proteínas indica que pertenecen a la familia de las proteínas guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUK). Dichas proteínas poseen uno o varios dominios, denominados PDZ, que posibilitan la interacción entre ZO-1 y ocludina.

Se ha determinado que ZO-1 es una proteína clave en la formación de las uniones estrechas, por lo que alteraciones en esta proteína pueden comprometer la integridad de la barrera epidérmica (Kaushal et al., 2011). ZO-1, además de localizarse asociada a la membrana, también ha sido localizada en el núcleo, pero tan solo en condiciones de crecimiento celular, nunca en células epiteliales diferenciadas.

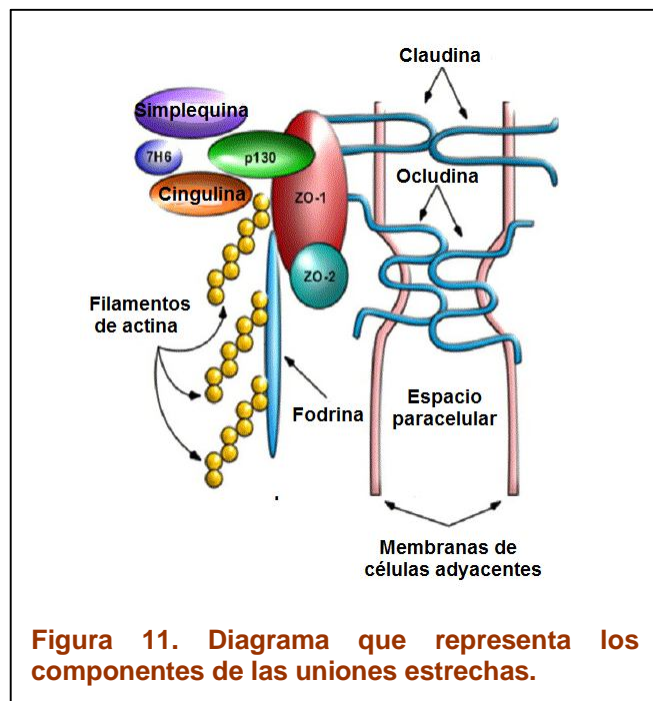


Figura 11. Diagrama que representa los componentes de las uniones estrechas.

2.2.6 Composición de las uniones adherentes

Cadherinas

Las cadherinas son las proteínas que forman las uniones adherentes y son dependientes de Ca^{2+} . Dentro de esta familia los dos miembros más estudiados son la E-cadherina (del epitelio) y la VE-cadherina (del endotelio vascular). La E-cadherina, que se expresa en todas las capas del epitelio (Brandner, 2009), es una proteína transmembrana que posee una cola citoplasmática que conecta con proteínas intercelulares (cateninas). Este complejo E-cadherina-catenina resultante se une a la vinculina y a la α -actinina, que interaccionan con los filamentos de actina del citoesqueleto. A este conjunto pueden reclutarse otras proteínas que estabilizan las uniones intercelulares. Los componentes extracelulares de las moléculas de E-

cadherina de células contiguas están ligados por iones Ca^{2+} o por una proteína extracelular adicional. Por lo tanto, la integridad morfológica y funcional de las uniones adherentes son calciodependientes. La eliminación de Ca^{2+} conduce a la disociación de las moléculas de E-cadherina y a la alteración de la unión intercelular.

- **Integrinas**

Las integrinas son proteínas compuestas por dos subunidades glucoproteicas diferentes (α y β) que atraviesan la membrana plasmática. Hay 15 variedades de subunidades α y 9 de subunidades β , lo que permite que se formen combinaciones diferentes que pueden unirse a proteínas diversas. Las integrinas interactúan con moléculas de la matriz extracelular (como el colágeno o la fibronectina) y con moléculas intracelulares (como los microfilamentos de actina y los filamentos intermedios del citoesqueleto). Mediante estas interacciones las integrinas regulan la adhesión celular, controlan el movimiento, la forma de las células, participan en el crecimiento y la diferenciación celular.

3 Hipótesis y objetivos

Hipótesis y objetivos

P. aeruginosa es un patógeno oportunista responsable de una gran variedad de infecciones entre las que destacan las infecciones respiratorias agudas y crónicas, las bacteremias en pacientes quemados y las queratitis ulcerosas.

Nuestro grupo ha demostrado que todas las cepas de *P. aeruginosa* presentan fosforilcolina en su superficie pero solamente cuando crecen a temperatura ambiente (<28°C), excepto algunos aislados, procedentes de infecciones respiratorias crónicas, que también presentan el epítipo de fosforilcolina al crecer a 37°C (Barbier et al., 2008).

La fosforilcolina es un factor de virulencia común en algunos patógenos respiratorios importantes, como *Streptococcus pneumoniae*, en el que la fosforilcolina se encuentra asociada al ácido teicoico y lipoteicoico (Cundell et al., 1995) o *Haemophilus influenzae*, en el que se encuentra asociada al lipopolisacárido (LPS) (Clark et al., 2012).

En *P. aeruginosa* el epítipo de fosforilcolina está asociada al factor de elongación Tu (EF-Tu) y media la interacción del microorganismo con las células epiteliales respiratorias a través del receptor activador de plaquetas (PAFR). Esta interacción contribuye a la virulencia de *P. aeruginosa in vivo* (Barbier et al., 2008).

Tal como hemos indicado anteriormente, *P. aeruginosa* es un importante patógeno en pacientes con quemaduras, llegando a ser el microorganismo más aislado en este tipo de heridas (Belba et al., 2013; Guggenheim et al., 2009; Taneja et al., 2013) y que con mayor frecuencia causa bacteremia (Dai et al., 2013). En estas infecciones, la bacteria procedente del ambiente, donde la expresión de fosforilcolina asociada a EF-Tu es máxima, infecta directamente las heridas. El hecho de que el motivo de fosforilcolina sea clave en las interacciones con el epitelio respiratorio en las infecciones respiratorias junto con que la presencia de este epítipo es predominante cuando el microorganismo crece a temperatura ambiente, nos permite plantear la hipótesis de que en *P. aeruginosa* la fosforilcolina asociada a EF-Tu podría ser un elemento clave para la interacción con los queratinocitos de la piel y contribuir a la patogénesis de la infección de heridas por quemadura.

Para comprobar si la hipótesis planteada era correcta, se propusieron los siguientes objetivos:

Identificar los aminoácidos de EF-Tu a los que se incorpora la fosforilcolina y determinar su localización celular.

Disecionar, a nivel celular y molecular, el papel de la fosforilcolina en la interacción de *P. aeruginosa* con los queratinocitos humanos.

Determinar la contribución de la fosforilcolina unida a EF-Tu en la infección de heridas por quemadura en un modelo murino.

4 Materiales y métodos

4.1 Bacterias, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo están indicadas en la tabla 2. Las bacterias se crecieron en medio Luria Bertani (LB) (Scharlau) suplementado, cuando fue necesario, con antibióticos de Sigma Aldrich, a las siguientes concentraciones: ampicilina 30 µg/ml, gentamicina 5 µg/ml, cefotaxima 1 µg/ml, carbenicilina 200 µg/ml y tetraciclina 15 µg/ml.

Cepa	Característica relevante	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Cepa de referencia secuenciada completamente aislada de herida de paciente	Sover et al., 2000
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Cepa de referencia secuenciada completamente aislada de paciente	Liberati et al., 2006
<i>P. aeruginosa</i> PA14_09870::MAR2xT7	Mutante por transposición de MAR2xT7 en el locus PA4178 de PA14	Liberati et al., 2006
<i>P. aeruginosa</i> PAO1Δ <i>eftM</i>	Mutante deficiente en <i>eftM</i> derivado de PAO1	Este trabajo
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17591	Aislamiento clínico	Bennasar et al., 1998
<i>Pseudomonas mendocina</i> ATCC 25411	Cepa aislada del suelo	Skerman et al., 1989
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000	Cepa aislada de tomatera	Buell et al., 2003
<i>Pseudomonas fulva</i> ATCC 31418	Promueve crecimiento radicular e inhibe el crecimiento fúngico	West, 2010
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F endA1 hsdR17 SupE44 thi recA1 gyrA96 relA1 deoR (lacZYA-argF)-U169 80dlacZ M15	Grant et al., 1990
<i>Escherichia coli</i> S17.1 ATCC 47055	RecA pro (RP4-2Tet::Mu Kan::Tn7)	Teng et al., 1998

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

En algunos experimentos las cepas se crecieron en Mueller-Hinton (MH) (Conda) o en medio Pseudomonas agar (Becton Dickinson) para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Obtención de antisuero específico contra EF-Tu

Para la obtención del antisuero específico contra la proteína EF-Tu, se inmunizó un conejo hembra raza New Zealand (Harlan Ibérica) con EF-Tu purificado. Para ello se inyectaron 80 µg de la proteína purificada por vía subcutánea, en tres ocasiones, con un intervalo de 2 semanas entre cada inyección. Para incrementar la respuesta inmunológica, la primera inmunización se realizó en adyuvante de Freud completo (Sigma Aldrich) y las otras dos en adyuvante de Freud incompleto (Sigma Aldrich), en una proporción 1:1 de proteína EF-Tu y adyuvante. Transcurridas dos semanas desde la última inyección, se sangró el animal y se determinó la presencia de anticuerpos específicos contra EF-Tu por Western Blot.

4.3 Métodos de purificación y análisis de proteínas

4.3.1 Obtención de extractos celulares totales

Los extractos celulares totales se obtuvieron tanto de bacterias como de células eucariotas. En el caso de las bacterias, las cepas fueron crecidas en LB a 25°C ó 37°C durante 16h con agitación. Seguidamente, se igualó la densidad óptica de los cultivos (absorbancia 600_{nm}=0,8) y se centrifugaron 5ml de cada cultivo a 5.000 x g durante 15min a temperatura ambiente. Una vez descartado el sobrenadante, se resuspendieron los precipitados bacterianos en tampón de carga, se hirvieron durante 5min y se guardaron a -20°C hasta su posterior análisis.

En el caso de las células eucariotas, las monocapas de células fueron incubadas durante 10min con el tampón de lisis RIPA (Santa Cruz).

4.3.2 Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares

Los extractos citoplasmáticos y nucleares de las células HaCaT se obtuvieron mediante el uso del Kit NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, las monocapas de células fueron secuencialmente despegadas mediante tratamiento con tripsina, recolectadas por centrifugaron, lavadas y tratadas con las soluciones CER I y CER II del kit para lisarlas. Tras una centrifugación, se recogió el sobrenadante, en el que estaba el contenido citoplasmático, y se incubó el precipitado con el reactivo de extracción de núcleos (NER). Tras una nueva centrifugación se recogió el sobrenadante que representaba el extracto nuclear.

4.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico. Los geles, de un grosor de 0,75mm, estaban compuestos de una zona de apilamiento de las proteínas y una zona de resolución cuyas composiciones puede consultarse en el apéndice. Se prepararon geles cuya concentración, en la zona de resolución, varió entre el 6 y el 15% de concentración final de acrilamida, en función del peso molecular de la proteína a analizar.

Las muestras, previamente hervidas durante 5min, se separaron mediante electroforesis a una intensidad constante inicial de 80V y una vez que las proteínas habían alcanzado la zona de resolución del gel, se elevó el voltaje hasta los 120V. Ver composición del tampón de electroforesis en el apéndice. Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular "Precision Plus Protein All Blue Standards" (Bio-Rad).

4.3.4 Transferencia Western e inmunodetección de proteínas

Las proteínas separadas en geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) mediante transferencia semiseca durante 20-60min a 15V. Las membranas de Immobilon-P fueron pretratadas con metanol y agua destilada antes del inicio de la transferencia, en la que se utilizó el tampón de transferencia Towbin (apéndice) y el sistema Transfer Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad).

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente en tampón fosfato salino con albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich) al 1% o con leche descremada al 5%, y posteriormente se incubaron a 4°C durante 16h con los distintos anticuerpos primarios (tabla 3), disueltos en el mismo tampón de bloqueo.

Tras tres lavados de 10min a temperatura ambiente con tampón fosfato salino, las membranas fueron incubadas durante 1h a 20°C con los distintos anticuerpos secundarios (tabla 4), atendiendo al isotipo primario. Después de otros tres lavados iguales a los anteriores, se procedió al revelado mediante la incubación de las membranas con el sustrato de la fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich).

Cuando fue necesario, se tomaron imágenes de las membranas y se cuantificó la intensidad de determinadas bandas mediante el densitómetro GS-800TM Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

Materiales y métodos

Antígeno/Epítipo detectado	Isotipo/Especie	Procedencia	Dilución utilizada
EF-Tu	IgG, policlonal de conejo	Este trabajo	1:1000
Fosforilcolina	IgA, monoclonal de ratón	Sigma Aldrich	1:2000
Di/trimetil-lisina	IgG, policlonal de conejo	Upstate	1:1000
Péptido FLAG	IgG1, monoclonal de ratón	Sigma Aldrich	1:1000
OprF	IgG, monoclonal de ratón	Mutharia & Hancock, 1983	1:1000
ZO-1	IgG, policlonal de conejo	Santa Cruz	1:200
Ocludina	IgG, policlonal de conejo	Millipore	1:1000
Claudina 7	IgG, policlonal de conejo	Abcam	1:100
β -actina	IgG, monoclonal de ratón	Sigma Aldrich	1:10000
Polihistidina	IgG2a, monoclonal de ratón	Sigma Aldrich	1:10000
NF- κ B p65	IgG, policlonal de conejo	Santa Cruz	1:200
NF- κ B p105/p50	IgG, monoclonal de conejo	Millipore	1:500
NF- κ B p65 fosforilado	IgG, policlonal de conejo	Cell signaling	1:1000

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en este estudio.

Antígeno detectado	Origen	Procedencia	Dilución utilizada	Molécula conjugada
IgA (α) ratón	Cabra	Invitrogen	1:5000	Fosfatasa alcalina
IgG conejo	Cabra	Sigma Aldrich	1:2000	Fosfatasa alcalina
IgG ratón	Cabra	Sigma Aldrich	1:50	Ficoeritrina
IgG ratón	Cabra	Sigma Aldrich	1:5000	Fosfatasa alcalina
IgG conejo	Cabra	Sigma Aldrich	1:30	Oro
IgG ratón	Cabra	Sigma Aldrich	1:20	Oro

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en este estudio.

4.3.5 Purificación de EF-Tu

La purificación de la proteína EF-Tu de *P. aeruginosa* se realizó a partir de las cepas PAO1, PAO1 Δ *eftM* o *Escherichia coli* DH5 α que contenían el plásmido pUCP18ApGw(*tufB*), que codifica la proteína EF-Tu con una cola de poli-histidinas. Para la purificación de la proteína mutada EF-Tu K5A, la cepa PAO1 contenía el plásmido pUCP18ApGw(*tufBK5A*), que codifica la proteína EF-Tu con una modificación en el residuo 5 (el codón de la lisina está sustituido por el de alanina).

Para la purificación, se crecieron las diferentes cepas a 25°C durante 18-20h con agitación en 100ml de LB con tetraciclina. Tras centrifugar los cultivos a 5.000 x *g* durante 15min y descartar los sobrenadantes, las bacterias se resuspendieron en 20ml de tampón de lisis (apéndice) al que se le añadió lisozima a una concentración final de 1mg/ml (Sigma Aldrich) y se incubaron en hielo durante 1h. Seguidamente, las suspensiones bacterianas fueron sonicadas (10 pulsos con 30s), y centrifugadas a 12.000 x *g* 5min a 4°C para eliminar las bacterias que no habían sido lisadas. A los sobrenadantes resultantes se añadieron 4ml de Ni-NTA y se incubaron durante 1h a 4°C con agitación orbital. Con el fin de eliminar aquellas moléculas unidas inespecíficamente, la resina fue lavada con 20ml del tampón de lavado y separada por centrifugación a 2.000 x *g* durante 2min a 4°C. Este paso de lavado se repitió 3 veces y, finalmente, la proteína purificada fue eluída por incubación de la resina con 1,5ml de tampón de elución (apéndice). La cantidad de proteína purificada se cuantificó mediante la técnica de Bradford (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante, y su pureza se confirmó por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie.

4.3.6 Espectrometría de masas

Para identificar los residuos modificados en EF-Tu se utilizó la técnica de espectrometría de masas. Las proteínas purificadas (30 μ g) se digirieron con tripsina porcina (0,2mg) (Promega) durante 18h a 37°C. Las proteínas digeridas se depositaron en una placa de MALDI de acero pulido (Bruker Daltonics), se les añadió el mismo volumen de matriz (ácido 2,5-hidroxibenzoico) (Sigma Aldrich) y se dejó secar al aire.

Los péptidos resultantes de la digestión fueron identificados con un Autoflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) equipado con un láser de 200Hz. Los espectros se registraron en modo reflector positivo entre 500 y 4300Da. Las condiciones de adquisición fueron: IS1 19kV, IS2 16,65kV, voltaje de la lente 8,3kV, voltaje del reflector 21kV y el voltaje del reflector 29,7kV. Los espectros se calibraron utilizando el "peptide calibration standard II" (Bruker Daltonics) o los picos de autólisis de la tripsina.

Con los espectros de péptidos obtenidos se realizaron búsquedas en la base de datos de MASCOT (Matrix Sciences), lo que permitió asegurar la correcta purificación de EF-Tu.

Para identificar los residuos de EF-Tu modificados se compararon los péptidos obtenidos de EF-Tu purificado a partir de distintas cepas. Una vez identificados los péptidos potencialmente modificados se confirmó su secuencia por espectrometría de masas en tandem.

4.3.7 Aislamiento de citoplasma y envolturas

Para separar el citoplasma de las envolturas bacterianas se recogieron, por centrifugación a 5.000 x g durante 15min, las células procedentes de un litro de cultivo crecido durante 20h a 25°C en LB con agitación. Tras un lavado con Tris 10mM (pH 7,3), se resuspendieron las bacterias en 20ml del mismo tampón y se lisaron en una French press. Las bacterias fueron sometidas dos veces a una presión de 10000-15000 libras/pulgada² y posteriormente se centrifugaron a 5.000 x g durante 15min a 4°C, para eliminar las bacterias no lisadas. El sobrenadante resultante se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 1h en frío, obteniéndose un sobrenadante que contenía las proteínas citosólicas, y un precipitado que contenía las envolturas bacterianas, es decir, la membrana interna y la membrana externa. Con el fin de eliminar proteínas citosólicas presentes en las envolturas, el precipitado fue resuspendido en el tampón de lavado y ultracentrifugado en las condiciones indicadas anteriormente. Finalmente, el precipitado resultante, que contenía las envolturas bacterianas, se resuspendió en 3ml de Tris HCl 10mM (pH 8) con EDTA 1mM. La concentración de proteínas presentes en el citoplasma y en las envolturas se determinó mediante la técnica de Bradford.

Para evaluar si la suspensión que contenía las envolturas bacterianas estaba contaminada con proteínas citosólicas, se analizó la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa siguiendo el método de Klotz (Klotz & Hutcheson, 1992). Para ello, en un volumen final de 900µl de Tris HCl 50mM (pH 8,9), que contenía β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato 2,7mM (Sigma Aldrich) y glucosa 6 fosfato 18mM (Sigma Aldrich), se añadieron 100µl de muestra que contenían 20µg de proteína y se realizaron lecturas espectrofotométricas a 340nm en cubeta de cuarzo cada 2min.

4.3.8 Separación de la membrana interna y externa de *P. aeruginosa*

Para la separación de la membrana interna y la externa, se utilizó el protocolo descrito por Hancock, que es de libre acceso en la página web: http://www.ihcworld.com/_protocols/lab_protocols/hancock-lab-protocols.htm.

Se partió de dos litros de cultivo bacteriano crecidos durante 20h a 25°C en LB con agitación. Las bacterias fueron recogidas por centrifugación 5.000 x g durante 15min y lavadas con Tris 10mM (pH 8,0) (Sigma Aldrich). Tras otro paso de centrifugación, las bacterias fueron resuspendidas en 20ml de una solución de sacarosa (Sigma Aldrich) al 20% en Tris 10mM (pH 8,0), a la que se añadieron 50µg/ml de DNAsa I (Sigma Aldrich) y se incubaron durante 15min a temperatura ambiente. Seguidamente, la suspensión bacteriana fue congelada a -80°C y después descongelada lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. La lisis bacteriana

se produjo mediante el paso de las células dos veces a través de una French press a 10000-15.000 libras/pulgada² (Carver Laboratory Press M, Fred S. Carver Inc). El homogenado resultante fue centrifugado a 5.000 x g durante 15min para eliminar las bacterias que no habían sido lisadas, y 4ml del sobrenadante resultante de dicha centrifugación se cargaron en un gradiente de sacarosa preparado en un tubo de 12ml de capacidad y en el que se había dispuesto 4ml de una solución de sacarosa al 70% en Tris 10mM (pH 8,0), 4ml de una solución de sacarosa al 50% en el mismo tampón. El gradiente se centrifugó a 188.000 x g durante 20h a 4°C.

En el gradiente resultante se observaron dos bandas, una inferior de color blanco que correspondía a la membrana externa, y una superior de color rojizo que correspondía a la membrana interna. Las fracciones que contenían dichas bandas fueron recogidas, diluidas con 3 volúmenes de agua destilada y centrifugadas a 227.000 x g durante 1h a 4°C. El sobrenadante resultante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en 200µl de agua destilada.

La cuantificación de las proteínas y la actividad glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en cada fracción se realizó tal como se ha descrito anteriormente.

4.4 Técnicas genéticas

Los plásmidos y cebadores utilizados en este estudio están indicados en las tabla 5 y 6, respectivamente.

Las enzimas utilizadas en todos los procedimientos (enzimas de restricción, T4 DNA ligasa, fosfatasa alcalina y DNA polimerasa) fueron suministradas por New England Biolabs y se usaron siguiendo las instrucciones del suministrador y/o los protocolos standard ([Sambrook & Gething, 1989](#)).

Para la purificación de ácidos nucleicos (DNA plasmídico y genómico) se utilizaron los kits de Qiagen siguiendo los protocolos correspondientes.

Materiales y métodos

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pEX100Tlink	ApR, <i>sacB</i> , vector suicida basado en pUC19 con un sitio con múltiples secuencias de restricción únicas para la clonación de fragmentos génicos	Quénée et al., 2005
pUCGm/ <i>lox</i>	ApR, GmR, vector basado en pUC18 con el gen <i>aac1</i> flanqueado por las secuencias <i>lox</i>	Quénée et al., 2005
pEXTeftM:: <i>Gm</i>	pEX100Tlink con el gen <i>eftm</i> :: <i>Gm/lox</i> para construir mutantes en dicho gen por delección	Este trabajo
pCM157	TcR, vector de expresión de la recombinasa <i>cre</i>	Quénée et al., 2005
pENTR/D-TOPO	Vector que permite la clonación de un producto de PCR en la orientación adecuada para incorporarlo al sistema de clonación Gateway	Invitrogen
pUCP18ApGw	Vector derivado de pUCP18 (Schweizer, 1991) por clonación del marco de lectura A del sistema de clonación Gateway	Este trabajo
pUCP18ApGw(<i>tufB</i>)	Vector de expresión con el gen <i>tufB</i> para la purificación de EF-Tu	Este trabajo
pUCP18ApGw(<i>tufBK5A</i>)	Vector de expresión con una versión mutada del gen <i>tufB</i> para la purificación de EF-Tu con la lisina 5 reemplazada por alanina	Este trabajo
pUCP18ApGw(<i>eftM</i>)	Vector de expresión con el gen <i>eftM</i> para la purificación de EftM	Este trabajo
Tabla 5. Plásmidos utilizados en este estudio.		

Cebador	Secuencia 5'->3'	Locus/gen diana
eftM-F-BhI	CCTTTGGGGATCCGGGAAC Incluye diana para <i>Bam</i> HI	PA4177
eftM-R-HdIII	GCTGAAGTAAGCTTCGGGGC Incluy diana para <i>Hind</i> III	PA4178/ <i>eftM</i>
eftM-F-HdIII	GGCAGAAGCTTCACCTTCGG Incluye diana para <i>Hind</i> III	PA4178/ <i>eftM</i>
eftM-R-ErI	CGTCGCGGAATTCGCGGTTG Incluye diana para <i>Eco</i> RI	PA4179
tufBF	CACCATGCATCATCATCATCATATGGCTAAAGAAAAATT TGA Secuencia compatible con sistema de clonación Gateway. Incluye cola de seis histidinas.	PA4277/ <i>tufB</i>
tufBR	TTATTTCGATGATCTTGGCAACC	PA4277/ <i>tufB</i>
tufBFK5A	CACCATGCATCATCATCATCATATGGCTAAAGAAGCATT TGA Secuencia compatible con sistema de clonación Gateway. Incluye cola de seis histidinas. Codón 5 que codifica lisina pasa a codificar alanina.	PA4277/ <i>tufB</i>
PA4178F	CACCATGGGACTACAAGGATGACGATGACAAGATGTCCGCCA CCGCG Secuencia compatible con sistema de clonación Gateway. Incluye cola FLAG.	PA4178/ <i>eftM</i>
PA4178R	CTAGCGCTTCACGCAGACGAACAG	PA4178/ <i>eftM</i>
Tabla 6. Cebadores utilizados en este estudio.		

4.4.1 Transformación

Para la preparación de células competentes se partió de un cultivo de 100ml en fase exponencial (Absorbancia 600nm = 0,3) realizado en LB a 37°C con agitación. Tras incubar el cultivo 15min en hielo, se recogieron las bacterias por centrifugación a 5.000 x g durante 15min. El sobrenadante resultante fue descartado y las bacterias fueron resuspendidas en 16ml del tampón TB1 frío (apéndice). La suspensión bacteriana se incubó de nuevo 15min en hielo, se centrifugó como antes y, una vez descartado el sobrenadante, se resuspendieron las bacterias en 4ml del tampón TB2 frío (apéndice). Seguidamente, la suspensión bacteriana fue alicuotada en fracciones de 300µl que fueron utilizadas directamente o congeladas inmediatamente a -80°C.

El protocolo de transformación consistió en mezclar DNA con una alícuota de células competentes e incubar la mezcla 10min en hielo, 90s a 42°C, 2min en hielo y 1h a 37°C con 1ml de LB.

4.4.2 Electroporación

Para la obtención de células competentes para electroporar se partió de un cultivo de 50ml en fase exponencial (Absorbancia 600nm = 0,5) realizado en LB a 37°C con agitación. Tras incubar el cultivo 10min en hielo, se recogieron las bacterias por centrifugación a 5.000 x *g* durante 15min. El sobrenadante resultante fue descartado y las bacterias fueron resuspendidas en 25ml del tampón SMEB frío. A continuación se realizaron dos lavados más de las células bacterianas utilizando las mismas condiciones de centrifugación y el mismo tampón, pero reduciendo el volumen de resuspensión a 5ml y 500µl. Finalmente, la suspensión bacteriana fue alicuotada en fracciones de 100µl que fueron utilizadas directamente o congeladas inmediatamente a -80°C.

El protocolo de electroporación consistió en mezclar DNA (5µl, 1µg) con una alícuota de células competentes e incubar la mezcla 5min en hielo. A continuación la mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación de 0,2cm, a la cual se le aplicaron 2,5KV en un pulso de 5ms, utilizando el equipo Gen Pulser Xcell (Bio-Rad). A continuación se añadió 1ml de LB líquido y se incubó a 37°C con agitación durante 1h. Posteriormente se plaquearon las bacterias sobre medio LB con la resistencia antibiótica adecuada.

4.4.3 Construcción del mutante deficiente en *eftM*

Para la construcción del mutante deficiente en la enzima EftM, se utilizó el protocolo descrito por Quénee y colaboradores (Quénee et al., 2005), siguiendo el esquema mostrado en la figura 12.

En primer lugar, utilizando cebadores específicos (tabla 6) que incorporaban los sitios de restricción indicados en la figura, amplificamos dos fragmentos del gen *eftM* separados entre sí por 100pb.

Los fragmentos resultantes se ligaron al vector pEX100Tlink en una ligación triple. Al vector resultante se le insertó el gen que confiere resistencia a gentamicina (*aacC1*) procedente del plásmido pUCGm/*ox* y el plásmido resultante fue introducido en *E. coli* DH5α por transformación. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB con ampicilina 30µg/ml y gentamicina 5µg/ml. Este plásmido, al ser derivado de pEX100Tlink, es incapaz de replicarse en *P. aeruginosa* (plásmido suicida), y además incorpora el gen *sacB* causante de la muerte celular en presencia de sacarosa. Para introducir este plásmido en *P. aeruginosa*, se transformó en primer lugar la cepa *E. coli* S17.1 y posteriormente se transfirió desde esta cepa a

Materiales y métodos

la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* por conjugación. Los transconjugantes se crecieron en placas de MH agar que contenían sacarosa al 5%, gentamicina 30µg/ml y cefotaxima 1µg/ml.

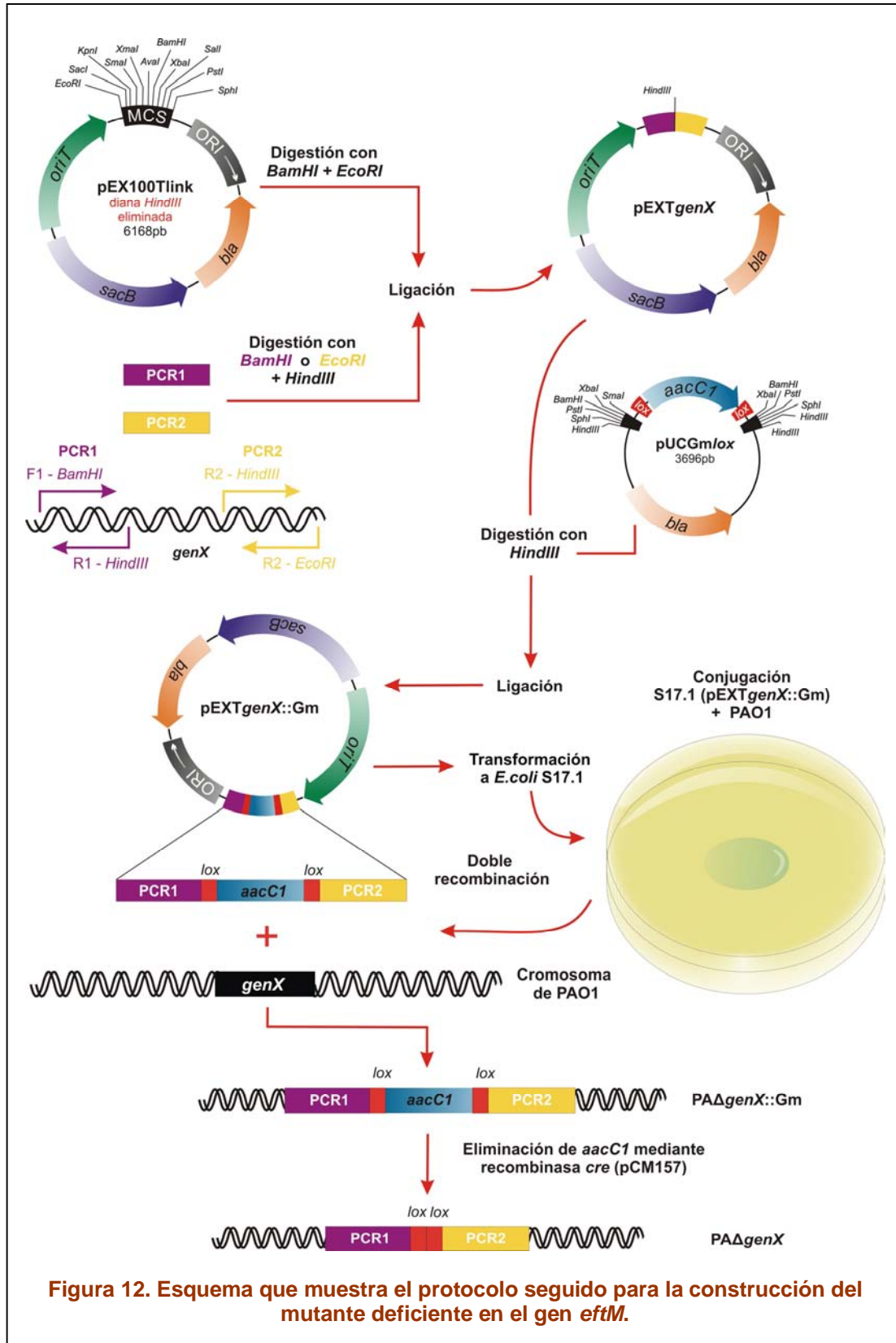


Figura 12. Esquema que muestra el protocolo seguido para la construcción del mutante deficiente en el gen *eftM*.

La incapacidad de replicación del plásmido pEX100Tlink en *P. aeruginosa*, la necesidad de integrar el gen de resistencia a gentamicina y la letalidad que provoca el gen *sacB* determinó la doble recombinación como única opción para la viabilidad celular. De esta manera, se seleccionaron células de *P. aeruginosa* doble recombinantes que tuvieran incorporado en su cromosoma el correspondiente gen mutado con el casete de gentamicina (*aacC1*) insertado y sin el gen silvestre y el plásmido pEX100Tlink. La ausencia del plásmido en los dobles recombinantes se verificó por la sensibilidad de éstos a la carbenicilina (200µg/ml). Finalmente, y con el fin de eliminar el casete de resistencia a gentamicina, los mutantes fueron transformados por electroporación con el plásmido pCM157 que es capaz de reconocer y recombinar las secuencias *lox* flanqueantes en el casete de resistencia a gentamicina. La fiabilidad de las construcciones así generadas fue confirmada por amplificación por PCR y secuenciación.

4.4.4 Construcción de los plásmidos pUCP18ApGw(*tufB*), pUCP18ApGw(*tufBK5A*) y pUCP18ApGw(*eftM*)

Estas construcciones se realizaron siguiendo las indicaciones del sistema de clonación Gateway (Life technologies) y los cebadores de la tabla 6. El gen *tufB* fue amplificado por PCR utilizando el DNA genómico de PAO1 y los cebadores *tufBF* y *tufBR*. El producto de PCR obtenido fue primero clonado en el vector pENTR/D-TOPO y luego transferido al vector de expresión compatible con Gateway pUCP18ApGw, que deriva de pUCP18, clonando el marco de lectura A del sistema de conversión del vector Gateway en el sitio *SmaI*, utilizando la clonasa LR. El plásmido resultante recibió el nombre de pUCP18ApGw(*tufB*).

Para la generación de la proteína mutante EF-Tu K5A, se utilizó el mismo protocolo explicado anteriormente, pero sustituyendo el cebador *tufBF* por el *tufBFK5A*, en el cual el codón que codificaba para una lisina en el gen *tufB*, fue sustituido por un codón que codificaba para la alanina. El plásmido resultante recibió el nombre de pUCP18ApGw(*tufBK5A*).

El gen *eftM* también fue clonado en el vector de expresión pUCP18ApGw utilizando el protocolo descrito anteriormente y los cebadores PA4178F y PA4178R en el genoma de PAO1. El plásmido resultante recibió el nombre de pUCP18ApGw(*eftM*).

4.5 Ensayos con cultivos celulares

4.5.1 Línea celular

Todos los ensayos se realizaron con la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT (Boukamp et al., 1988).

Para el mantenimiento y crecimiento de esta línea celular se utilizó medio DMEM/Ham's F-12 con L-Glutamina (PAA), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal, previamente

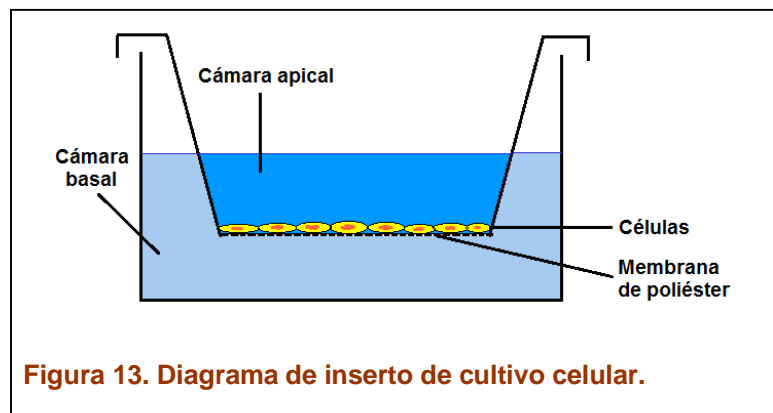
Materiales y métodos

inactivado por calor, y un 1% de una combinación de antibióticos que consistía en penicilina, estreptomina y fungizone. Las células se crecieron a 37°C y 5% CO₂ sobre plástico o membranas de poliéster, ambos previamente recubiertos durante 18h a 37°C con la solución de recubrimiento que contenía fibronectina-colágeno y albúmina sérica bovina (BSA) en un tampón hepes salino (HBS) (apéndice).

4.5.2 Ensayos de invasión y transmigración bacteriana

Para medir la entrada y el paso de *P. aeruginosa* en y a través de células HaCat polarizadas, utilizamos unos insertos de poliéster que disponían de dos cámaras de cultivo separadas por una membrana con un tamaño de poro de 3µm (Corning Costar Corp.) (figura 13) dispuestos en placas de cultivo de 12 pocillos. Para estos experimentos se depositaron 5x10⁴ células por pocillo y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia, cuando fueron transferidas al medio de diferenciación (Uchida et al., 2001). La resistencia eléctrica transepitelial (RET) se midió mediante el uso del Ohmímetro (EVOMX; World Precision Instruments) y con el electrodo STX100.

Las células fueron infectadas con 2x10⁷ bacterias/ml (relación bacteria/queratinocito 50:1) que habían crecido en LB agar a 25°C y habían sido resuspendidas en medio DMEM/Ham's F-12. A las 2, 4 y 6h después de la infección se recogieron



100µl de la cámara apical para determinar la viabilidad celular y otros 100 de la cámara basal que fueron diluidos y depositados en placas de LB agar para cuantificar el número de bacterias que habían cruzado la capa de queratinocitos. Seguidamente, se retiró el medio de ambas cámaras, se lavaron los insertos tres veces con PBS, y se incubaron durante 1h en medio DMEM/Ham's F-12 con gentamicina 100µg/ml en ambas cámaras para eliminar la bacterias extracelulares. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con PBS y las células fueron lisadas con Triton X-100 (Sigma Aldrich) al 0,5% en PBS durante 10min. Finalmente, para cuantificar el número de bacterias que habían entrado en las células, se plaquearon distintas diluciones del lisado celular sobre placas de LB agar.

4.5.3 Inhibición de la transmigración por el antagonista PAFR

Células HaCaT crecidas sobre insertos de poliéster, como se ha descrito anteriormente, fueron pre-tratadas durante 30 minutos con antagonista del PAFR (1-O-Hexadecyl-2-acetyl-sn-

glycero-3-phospho-(N,N,N-trimethyl)-hexanolamine) (Alexis) a una concentración de 75nM o, en el caso de los controles, con un volumen equivalente del vehículo (etanol absoluto). Ambos tratamientos se diluyeron en DMEM/Ham's F-12. Tras esta incubación, se retiró el medio de las cámaras apical y basal, colocando medio DMEM/Ham's F-12 en la cámara basal, y la suspensión bacteriana en la cámara apical. La suspensión bacteriana (2×10^7 bacterias/ml, crecidas en LB agar a 25°C), se preparó en medio de cultivo que contenía el antagonista 75nM o el vehículo. Tras 2h de infección en presencia del antagonista, se retiró la suspensión bacteriana, se lavó con PBS la cámara apical y se volvió a rellenar con medio de cultivo. Tras una hora de incubación se realizaron plaqueos cuantitativos de la cámara basal para determinar la transmigración bacteriana.

4.5.4 Medición de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante la valoración de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio como consecuencia de la lisis celular. La actividad de la LDH se cuantificó con el Kit de detección de citotoxicidad de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.5.5 Medición de la permeabilidad paracelular

La permeabilidad paracelular se midió mediante el uso de dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Aldrich). Para ello, tras infectar las células durante 6h, tal como se ha descrito en los ensayos de transmigración bacteriana, el medio de cultivo de la cámara apical, que contenía la suspensión bacteriana, fue reemplazado por medio de cultivo que contenía dextrano marcado con FITC a una concentración de 100µg/ml. Por su parte, el medio de cultivo de la cámara basal se reemplazó por medio de cultivo fresco. Al cabo de 1h, se determinó la fluorescencia en la cámara basal mediante un fluorímetro (Cary Eclipse), utilizando una longitud de onda de excitación de 485nm y una longitud de onda de emisión de 530nm.

4.6 Técnicas de microscopía

4.6.1 Microscopía electrónica de barrido

Las membranas de los insertos de poliéster sobre las que se habían realizado cultivos de células HaCaT polarizadas y que habían sido infectadas con *P. aeruginosa*, fueron preparadas para su observación al microscopio electrónico de barrido. Para ello, tras los distintos tratamientos, las membranas de los insertos se lavaron tres veces con PBS y se fijaron sumergiéndolas 18h a 4°C en una solución con glutaraldehído al 3% en PBS. Seguidamente, las muestras fueron deshidratadas por sucesivos tratamientos de 10 minutos de duración a

temperatura ambiente con etanol al 25%, 50%, 75% y 100%. Finalmente, las muestras fueron recubiertas con oro y visualizadas en el microscopio electrónico de barrido (Hitachi S3400N).

4.6.2 Inmunomicroscopía de fluorescencia

Para la observación de las uniones intercelulares establecidas entre las células HaCaT, éstas fueron crecidas hasta la confluencia sobre cubreobjetos de plástico (Sarstedt), permeabilizadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con Triton al 0,1%, lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 3,7% en PBS a 4°C durante 20 minutos. Tras realizar tres lavados con PBS, para eliminar por completo la solución fijadora, las muestras fueron bloqueadas con PBS-BSA al 3% e incubadas sucesivamente con anticuerpos monoclonales de ratón anti-ZO-1 (1:50) y anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con ficoeritrina (1:50), ambos diluidos con PBS-BSA al 3%. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C durante 1 hora con tres lavados con PBS entre cada incubación. Finalmente, las muestras fueron cubiertas con medio de montaje DAKO® Fluorescent (DakoCytomation) y observadas en el microscopio confocal (Leica).

4.7 Técnicas con Animales

4.7.1 Modelo animal de infección en quemaduras

Para estos estudios se utilizaron ratones BALB/c hembra de entre 20 y 25g, que fueron estabulados en grupos de 6 animales por caja, con acceso a la comida y al agua *ad libitum*, con un fotoperíodo de 12h de luz y 12h de oscuridad, con una temperatura ambiental de unos 21°C y un rango de humedad de entre el 30 y 70%.

Para realizar la quemadura y la infección seguimos el protocolo previamente descrito por Nichols y colaboradores (Nichols et al., 2013). Los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con una mezcla de anestésico y relajante muscular (10µl de ketamina (Imalgène 1000) + 5µl de xilacina (Xilagesic 2%) por cada 10g de peso corporal). Una vez anestesiados se procedió a afeitar una superficie de aproximadamente un centímetro cuadrado, de la zona de la espalda. La quemadura se realizó mediante una varilla metálica maciza de un diámetro aproximado de 0,5cm, que se mantuvo en un vaso con agua hirviendo. Cuando el animal seguía bajo los efectos de la anestesia, se aplicó sobre la piel afeitada el extremo de la varilla hirviendo durante 5 segundos. Tras producir la quemadura, y con el animal aún anestesiado, se infectaron los ratones por vía subcutánea inyectando un volumen de 60 µl de una suspensión bacteriana en PBS. La suspensión bacteriana se obtuvo a partir de cultivos en fase exponencial crecidos a 25°C en caldo LB. A continuación se aplicó suero salino para hidratar la zona quemada. Los animales fueron vigilados a lo largo de 7 días.

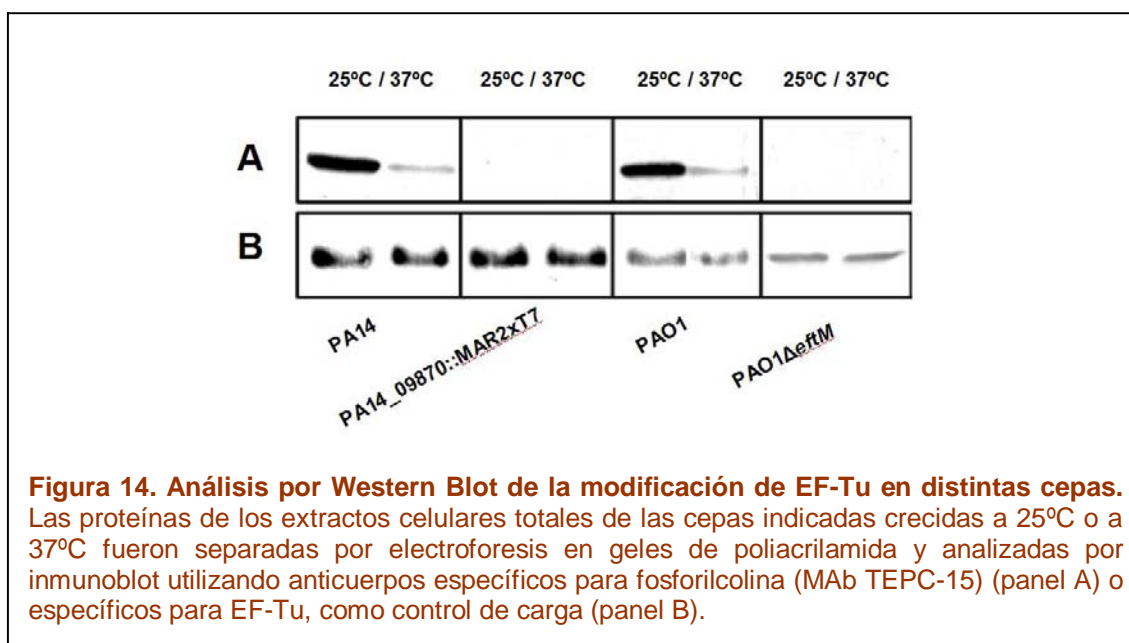
Materiales y métodos

Para la determinación de la presencia de bacterias en sangre, cada 12h se realizó una pequeña incisión en la vena de la cola de la que se recogieron aproximadamente 10 μ l de sangre que fueron plaqueados inmediatamente sobre placas de medio Pseudomonas.

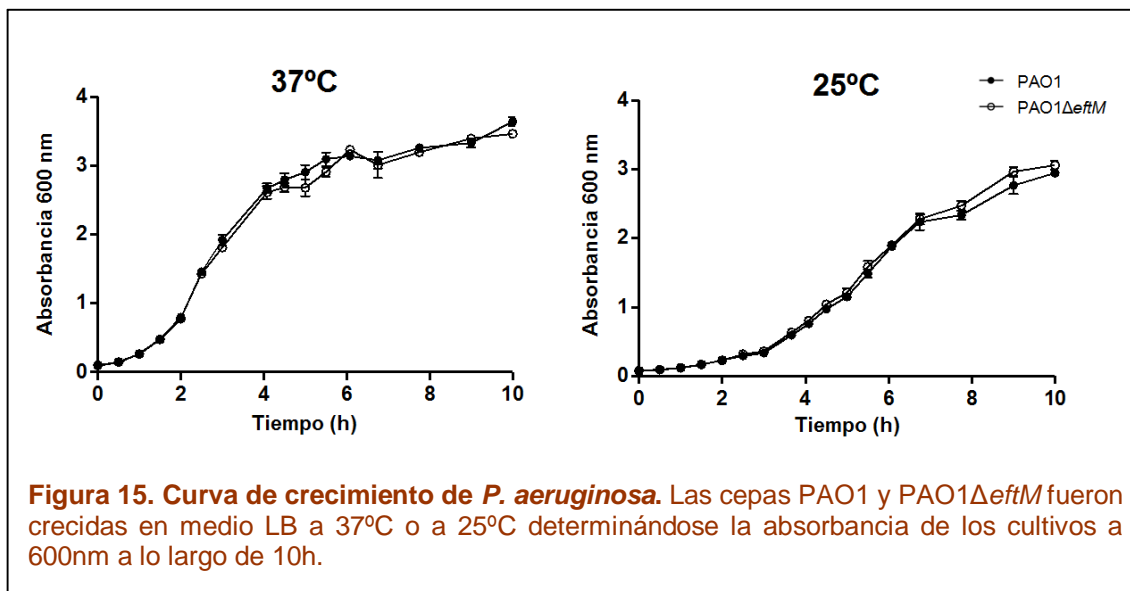
5 Resultados

5.1 Construcción de un mutante deficiente en la modificación de EF-Tu

En un trabajo previo (Barbier, 2010), el análisis por Western Blot con el anticuerpo monoclonal MAb TEPC-15, específico contra el epítipo de fosforilcolina, de los extractos celulares totales de cada uno de los 5.514 mutantes de la librería de mutantes derivada de la cepa *P. aeruginosa* PA14 construida por Liberati y col. (Liberati et al., 2006) identificó un solo mutante, PA14_09870:MAR2xT7, deficiente en la capacidad de modificar EF-Tu con fosforilcolina tanto a 25°C como a 37°C (figura 14). En este mutante, el transposón MAR2xT7 estaba localizado en el locus PA4178 que, hipotéticamente, codifica una metiltransferasa. A este gen le denominamos *eftM*, del inglés “Elongation Factor Tu Modifying enzyme” y a su producto EftM. Para la realización de este trabajo construimos el mutante PAO1 Δ *eftM* insertando por doble recombinación alélica en la cepa PAO1 una versión del gen *eftM* con una delección interna, tal como se ha descrito anteriormente en la sección de métodos. Tal como se observa en la figura 14A, el mutante PAO1 Δ *eftM* también fue incapaz de modificar EF-Tu a 25°C y a 37°C, mientras que los niveles de EF-Tu eran similares a los de la cepa parental PAO1 (figura 14B).



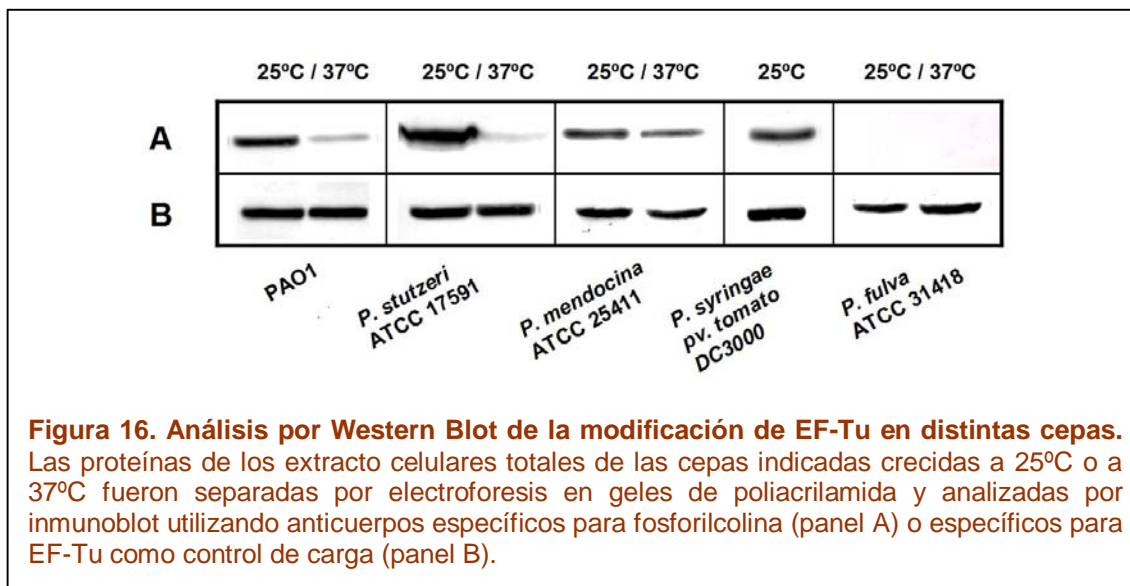
La cepa parental PAO1 y el mutante PAO1 Δ *eftM* mostraron tasas de crecimiento similares sin diferencias significativas tanto a 37°C como a 25°C; el tiempo de duplicación de la fase exponencial varió entre 33 y 36 min a 37°C y entre 92 y 96 min a 25°C (figura 15). Además, la cantidad total de proteína por bacteria para ambas cepas fue similar (PAO1; 1100 \pm 80fg/ufc, PAO1 Δ *eftM*; 1000 \pm 10fg/ufc).



5.2 Conservación del enzima en otras especies

La proteína EftM está conservada en todos los genomas completos de las cepas de *P. aeruginosa* presentes en <http://www.pseudomonas.com> (Winsor et al., 2011) con una excepción, *P. aeruginosa* DK2 (aislado de un paciente con FQ que se sabe que tiene deleciones genómicas) (Rau, Marvig, Ehrlich, Molin, & Jelsbak, 2012; Yang et al., 2011). De las cepas de *P. aeruginosa* presentes en la base de datos, PA7 es la que presenta una menor identidad de secuencia (87%), mientras que todas las otras tienen una identidad de sus secuencias superior al 99%, con respecto a la del enzima EftM de PAO1. En muchas otras especies de *Pseudomonas* también existen homólogos de EftM, incluyendo *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. fulva* y *P. syringae*. En estas cuatro especies la homología con la secuencia aminoacídica del enzima EftM de PAO1 es siempre superior al 70%, concretamente *P. mendocina* NK-01 tiene una identidad de secuencia del 74,09%, *P. stutzeri* DSM10701 del 73,17%, *P. syringae* pv. tomato DC3000 del 80,97% y *P. fulva* 12-X del 70,45%.

Para determinar si los homólogos de EftM, presentes en otras especies de *Pseudomonas*, son activos y tienen la misma función que en *P. aeruginosa*, decidimos investigar si la proteína EF-Tu, de un representante de cada una de estas especies, reaccionaba con el anticuerpo MAb TEPC-15 específico para fosforilcolina. El análisis por Western Blot de los extractos de proteínas totales de las cepas *P. mendocina* ATCC 25411, *P. stutzeri* ATCC 17591 y *P. syringae* pv. tomato DC3000 crecidas a 25°C, demostró que, al igual que en *P. aeruginosa*, EF-Tu reacciona con el anticuerpo anti-fosforilcolina. Por el contrario, la proteína EF-Tu presente en los extractos celulares de la cepa de *P. fulva* ATCC 31418, crecida tanto a 25 como a 37°C, no reaccionó con el anticuerpo.



El análisis por BLAST utilizando la secuencia de la proteína EftM indica la gran distribución de homólogos entre otras gammaproteobacterias (incluyendo *Shewanella* sp. y *Vibrio* sp.), así como *Firmicutes*.

5.3 Identificación de los residuos modificados por EftM en EF-Tu

Con el fin de identificar los residuos de aminoácidos de EF-Tu que eran modificados por EftM y que permitían que el factor de elongación reaccionara con el anticuerpo anti-fosforilcolina, purificamos EF-Tu, tanto de la cepa parental PAO1 como del mutante PAO1 Δ *eftM*, ambas crecidas a 25°C. Para la purificación de EF-Tu de *P. aeruginosa* clonamos el gen *tufB* en el vector pUCP18ApGw incorporando una cola de histidinas en el extremo N-terminal de EF-Tu para dar lugar al plásmido pUCP18ApGw(*tufB*) que fue introducido en PAO1 y PAO1 Δ *eftM*. Las proteínas purificadas fueron analizadas por espectrometría de masas en tándem previa digestión con tripsina. El análisis de EF-Tu purificado a partir de PAO1 Δ *eftM* identificó un pico con una masa de 708,365Da correspondiente al péptido con los residuos 4-8 (EKFER) de EF-Tu de *P. aeruginosa* (figura 16A). El análisis de EF-Tu purificado de PAO1 crecida a 25°C identificó un pico con una masa de 750,412Da (figura 16B). Este incremento se correspondía con la adición de tres grupos metilo (42,047Da) al residuo 5 de lisina. Para confirmar este resultado reemplazamos exclusivamente el residuo 5 de lisina por una alanina dando lugar a la proteína EF-Tu K5A. El análisis por espectrometría de masas de EF-Tu K5A purificada de PAO1 demostró la ausencia de grupos metilo identificando un pico con una masa de 651,319Da correspondiente al péptido EAFER (figura 16C).

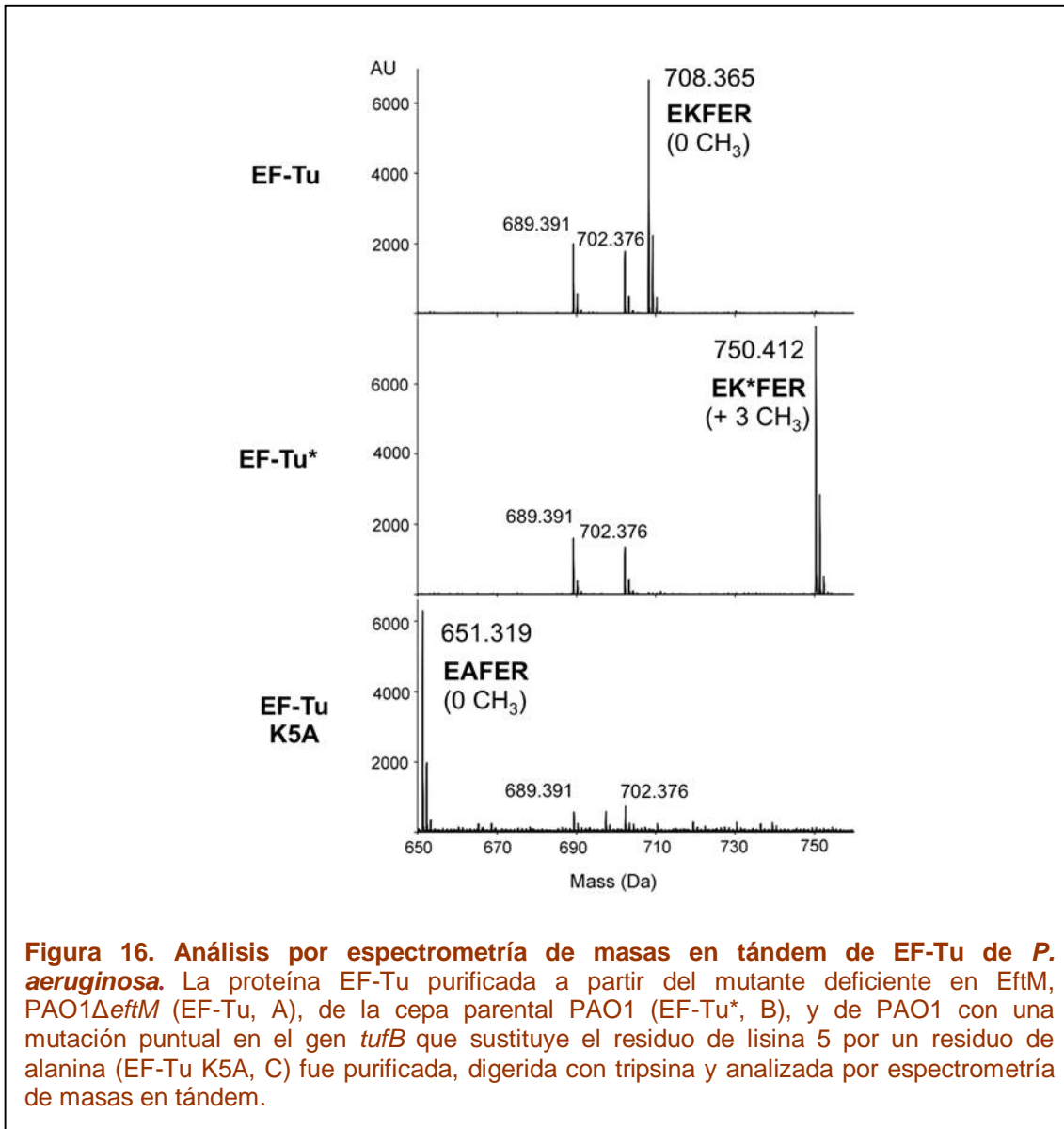
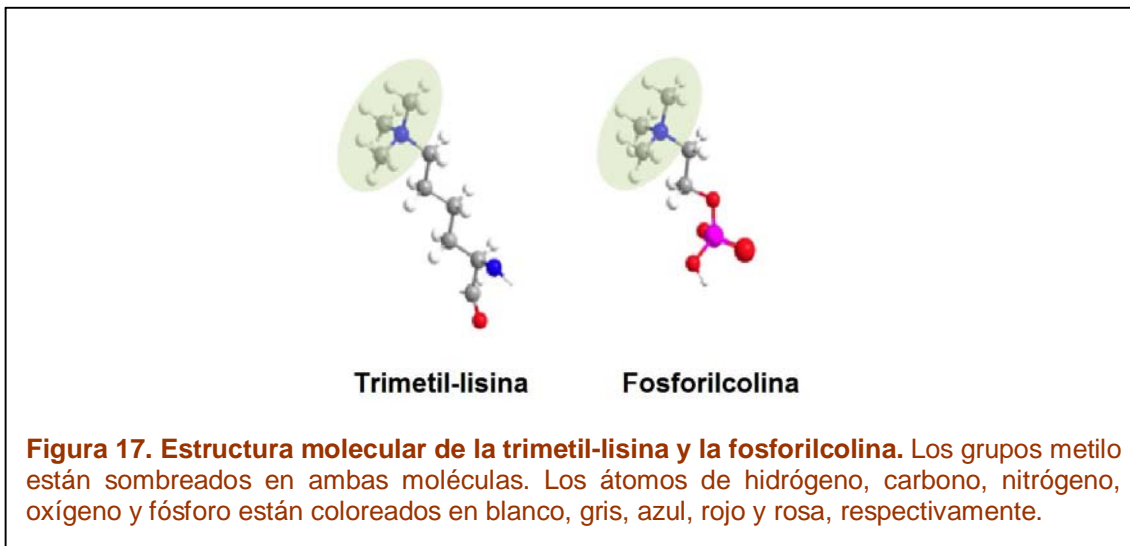
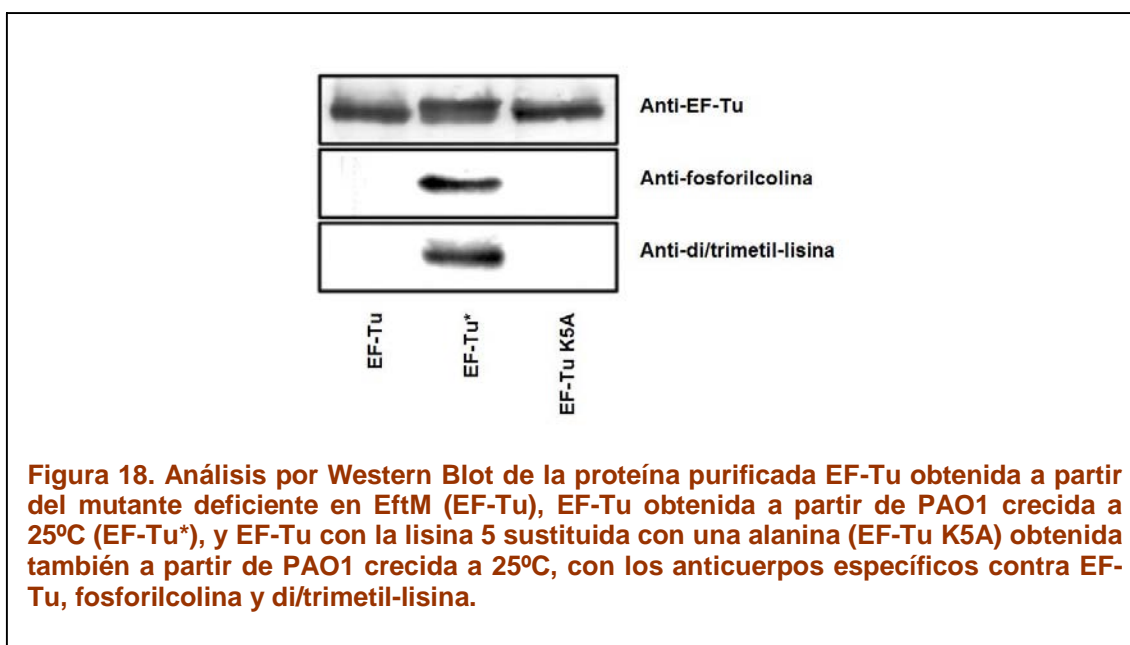


Figura 16. Análisis por espectrometría de masas en tándem de EF-Tu de *P. aeruginosa*. La proteína EF-Tu purificada a partir del mutante deficiente en EftM, PAO1 Δ *eftM* (EF-Tu, A), de la cepa parental PAO1 (EF-Tu*, B), y de PAO1 con una mutación puntual en el gen *tufB* que sustituye el residuo de lisina 5 por un residuo de alanina (EF-Tu K5A, C) fue purificada, digerida con tripsina y analizada por espectrometría de masas en tándem.

Estos resultados indican que EftM modifica única y exclusivamente el residuo 5 de lisina de EF-Tu, incorporando tres grupos metilo a este residuo dando lugar a una estructura muy similar al epítipo de fosforilcolina (figura 17).



Para confirmar este resultado, investigamos si las proteínas que habían sido analizadas por espectrometría de masas en tándem reaccionaban con los anticuerpos específicos contra fosforilcolina o contra di/trimetil-lisina. Tal como se muestra en la figura 18, la proteína EF-Tu purificada a partir de PAO1 crecida a 25°C (señalada en la figura como EF-Tu*) reaccionó con ambos anticuerpos a diferencia de las proteínas EF-Tu purificada a partir de la cepa mutante deficiente en EftM (señalada en la figura como EF-Tu) o la proteína EF-Tu K5A que presenta la sustitución de la lisina 5 por una alanina purificada a partir de PAO1 crecida a 25°C (EF-Tu K5A). Estos resultados indican que la modificación post-traducciona de EF-Tu detectada por el anticuerpo específico contra fosforilcolina MAb TEPC-15 es en realidad una trimetilación del residuo 5 de lisina de EF-Tu.



Resultados

Para ratificar la actividad de EftM, transferimos el plásmido pUCP18ApGw(*eftM*), que expresa el gen *eftM* constitutivamente bajo la dirección del promotor *lacZ*, al mutante deficiente en EftM derivado de PAO1, PAO1 Δ *eftM*, así como a *Escherichia coli* DH5 α , que no presenta ningún gen homólogo a *eftM* en su genoma. El análisis por Western Blot de las cepas portadoras del plásmido demostró que *eftM* es suficiente para modificar EF-Tu, incluso en un sistema heterólogo como es *E. coli* (figura 19).

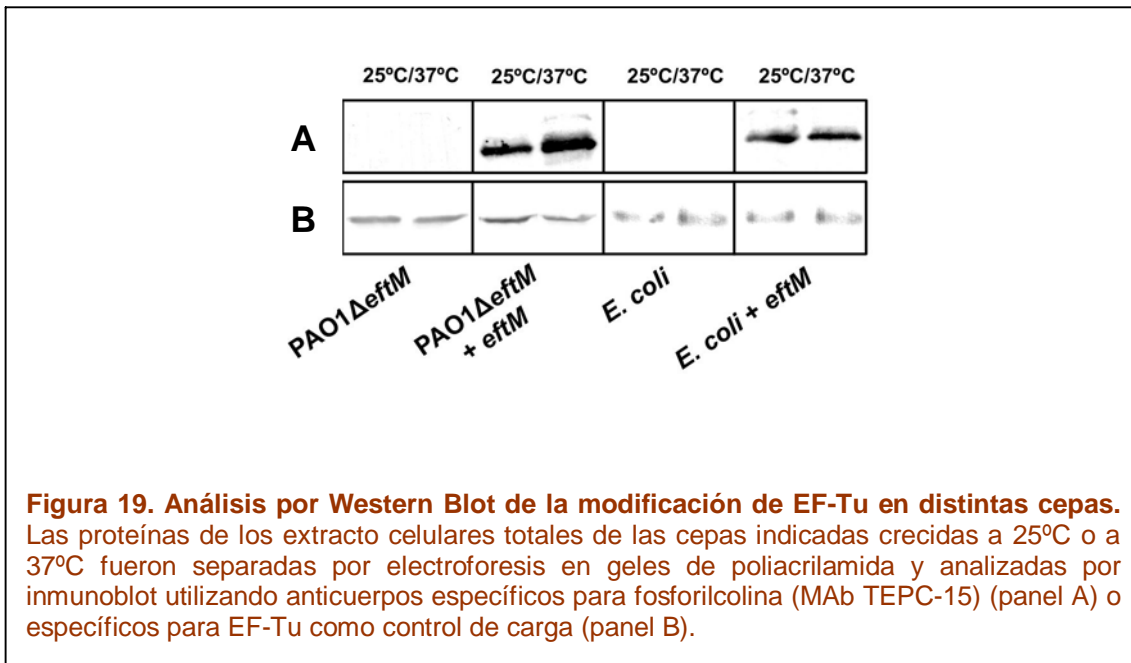


Figura 19. Análisis por Western Blot de la modificación de EF-Tu en distintas cepas. Las proteínas de los extracto celulares totales de las cepas indicadas crecidas a 25°C o a 37°C fueron separadas por electroforesis en geles de poliácridamida y analizadas por inmunoblot utilizando anticuerpos específicos para fosforilcolina (MAb TEPC-15) (panel A) o específicos para EF-Tu como control de carga (panel B).

Además, el análisis por espectrometría de masas de la proteína EF-Tu de *P. aeruginosa* purificada a partir de la cepa de *E. coli* pUCP18ApGw(*tufB*) + pUCP18ApGw(*eftM*), que expresaba simultáneamente EF-Tu recombinante y EftM, identificó la misma modificación que observamos en PAO1 crecida a 25°C (figura 20).

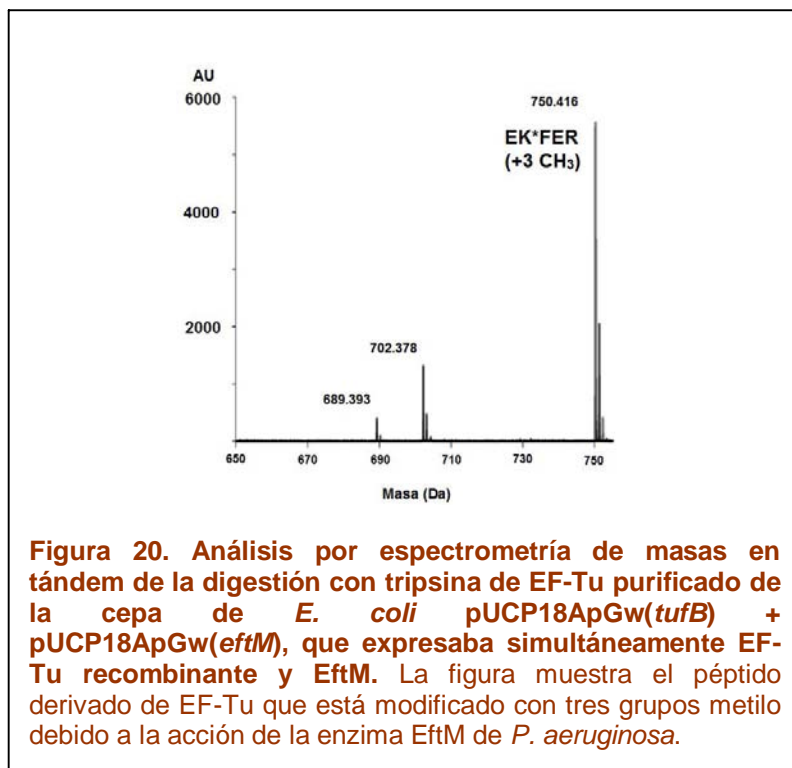


Figura 20. Análisis por espectrometría de masas en tándem de la digestión con tripsina de EF-Tu purificado de la cepa de *E. coli* pUCP18ApGw(*tufB*) + pUCP18ApGw(*eftM*), que expresaba simultáneamente EF-Tu recombinante y EftM. La figura muestra el péptido derivado de EF-Tu que está modificado con tres grupos metilo debido a la acción de la enzima EftM de *P. aeruginosa*.

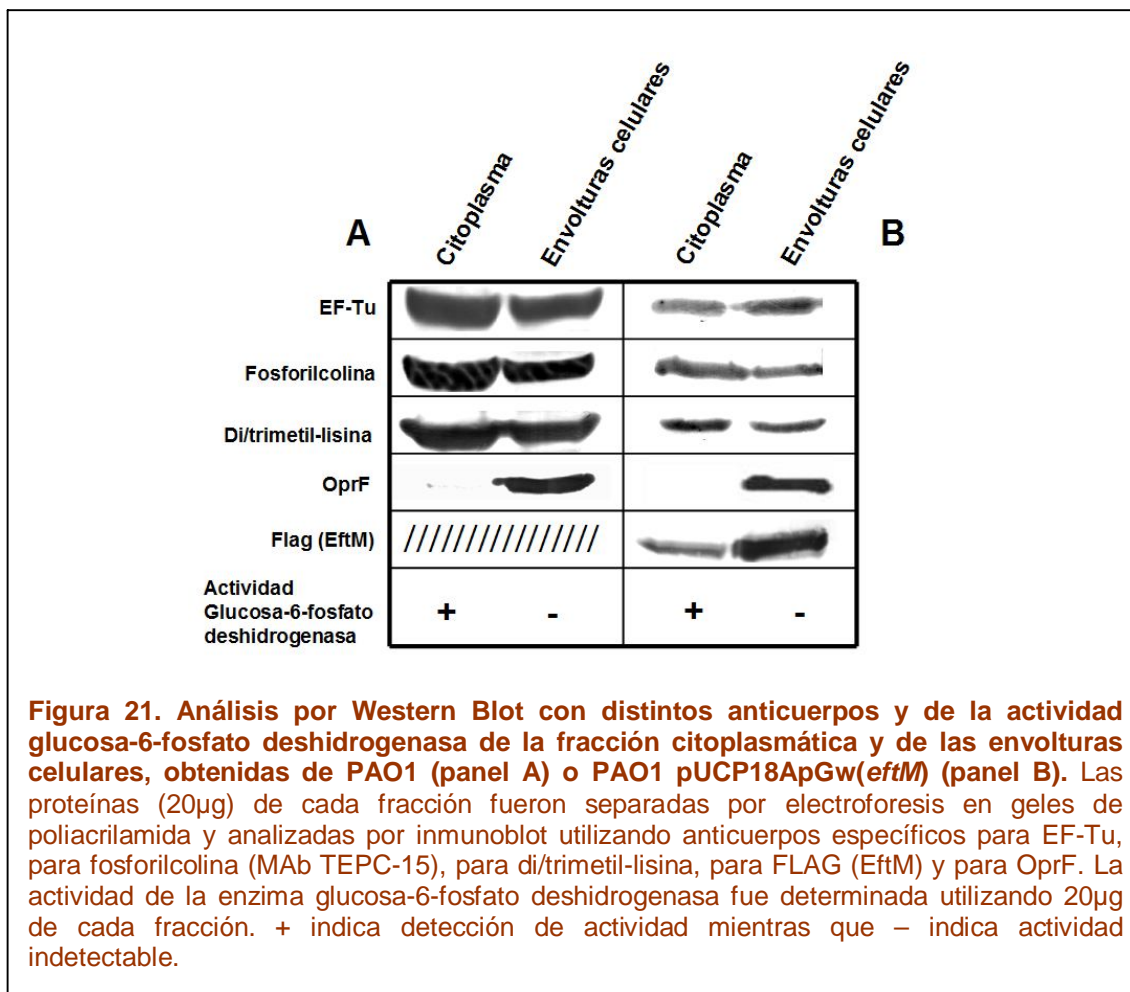
En su conjunto, estos resultados indican que *eftM* codifica una nueva metiltransferasa que es capaz y suficiente para modificar el residuo 5 de lisina de EF-Tu dando lugar a una estructura químicamente similar a la fosforilcolina presente en el factor activador de plaquetas.

5.4 Localización celular de EftM.

EF-Tu es la proteína bacteriana más abundante en el citoplasma siendo un componente esencial para la síntesis de proteínas. EF-Tu también puede encontrarse en la superficie donde puede interactuar con el hospedador (Barbier et al., 2008; Kunert et al., 2007).

Con el fin de localizar en que compartimento celular se encuentra la enzima EftM y en que lugar lleva a cabo la trimetilación de EF-Tu, aislamos las fracciones celulares correspondientes al citoplasma y las envolturas de la cepa parental PAO1 crecida a 25°C en LB y determinamos la presencia de EF-Tu modificado en cada una de ellas mediante el uso de anticuerpos específicos (figura 21A).

Como era de esperar, el análisis por Western Blot con anticuerpos específicos para EF-Tu detectó la presencia de esta proteína tanto en la fracción citoplasmática como en las envolturas celulares. La proteína EF-Tu presente en el citoplasma reaccionó tanto con el anticuerpo MAb TEPC-15 para fosforilcolina como con el anticuerpo para di/trimetil-lisina sugiriendo que la modificación post-traducciona debe llevarse a cabo en el citosol de la célula bacteriana. Para confirmar este resultado determinamos en que fracción celular estaba la enzima EftM responsable de la modificación. Para ello, al no disponer de anticuerpos específicos para EftM, aislamos la fracción citoplasmática y las envolturas celulares de la cepa PAO1 pUCP18ApGw(*eftM*) que es portadora de la proteína EftM recombinante marcada con el péptido FLAG en el extremo N-terminal de la proteína, lo que permite su detección con anticuerpos anti-FLAG (figura 21B). El análisis de la fracción citoplasmática con estos anticuerpos indicó que EftM está presente en el citosol de la célula por lo que, atendiendo a los resultados anteriores, la modificación post-traducciona de EF-Tu se produce en el citoplasma de la célula bacteriana.



El análisis de las envolturas celulares también detectó la presencia de EF-Tu modificado en ellas lo que, en principio, podría sugerir que EF-Tu, una vez modificado, es transportado a la envoltura celular por un mecanismo todavía desconocido. Sin embargo, también pudimos detectar la presencia de EftM en las envolturas celulares, por lo que no podemos descartar que la modificación de EF-Tu también se produzca en las envolturas.

La calidad de las fracciones aisladas en cada caso fue evaluada mediante el análisis de cada una de ellas por Western Blot con anticuerpos específicos contra OprF, una proteína exclusiva de membrana externa, y mediante la determinación de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una enzima exclusivamente citoplasmática.

Las envolturas celulares contenían tanto la membrana citoplasmática o interna como la membrana externa. Para investigar con mayor detalle la localización de EF-Tu modificado aislamos por gradiente de densidad la membrana externa e interna de PAO1 crecida a 25°C en LB y determinamos la presencia de EF-Tu trimetilado en cada una de ellas mediante el uso de anticuerpos específicos (figura 22A). La presencia de EF-Tu trimetilado fue detectada tanto en la membrana interna como en la externa. La ausencia de actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en las dos fracciones indicó la ausencia de contaminación

Resultados

citoplasmática en ambas muestras. Además, la membrana interna no estaba contaminada por proteínas de la membrana externa ya que el anticuerpo específico para OprF no detectó su presencia en la membrana interna.

Para determinar la localización de EftM utilizamos la misma estrategia, pero en este caso aislando las membranas a partir de la cepa PAO1 pUCP18ApGw(*eftM*) y detectando EftM indirectamente mediante el uso de anticuerpos anti-FLAG, como hemos descrito anteriormente (figura 22B). Los resultados del análisis de la membrana interna y externa de esta cepa indicaron que EftM estaba presente, predominantemente, en la membrana externa.

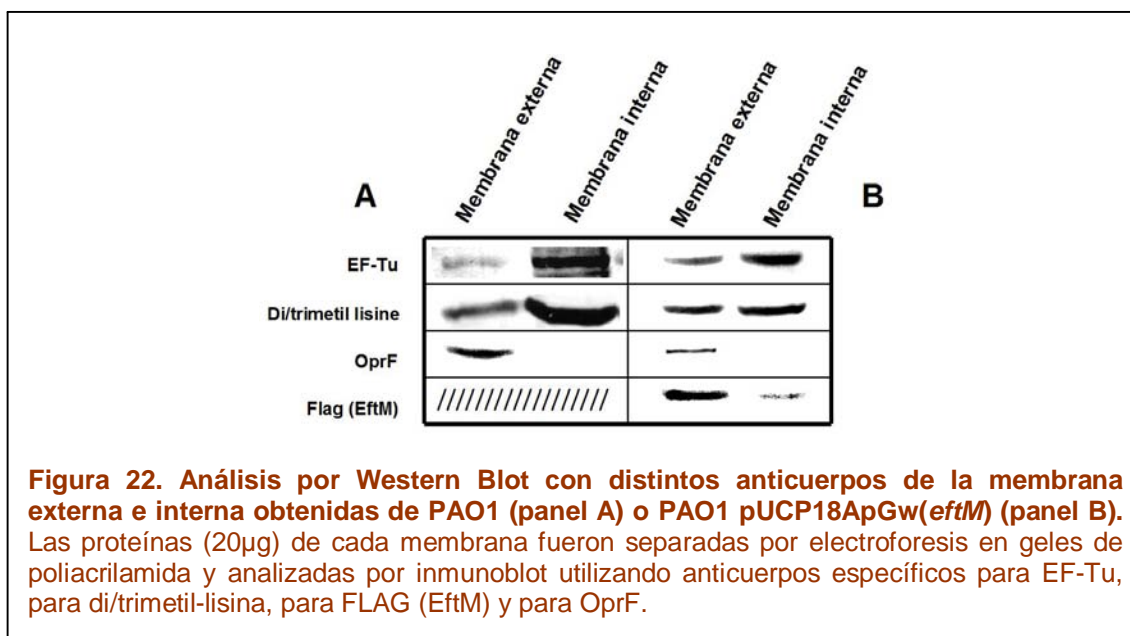


Figura 22. Análisis por Western Blot con distintos anticuerpos de la membrana externa e interna obtenidas de PAO1 (panel A) o PAO1 pUCP18ApGw(*eftM*) (panel B). Las proteínas (20µg) de cada membrana fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y analizadas por inmunoblot utilizando anticuerpos específicos para EF-Tu, para di/trimetil-lisina, para FLAG (EftM) y para OprF.

Los resultados obtenidos en el análisis de las fracciones fueron verificados por inmunomicroscopía electrónica (figura 23). Las secciones de células de PAO1 crecida a 25°C fueron incubadas con anticuerpos específicos para EF-Tu que posteriormente fueron detectados con anticuerpos marcados con oro y visualizadas en el microscopio electrónico de transmisión. La proteína EF-Tu se localizó tanto en el citoplasma como en las membranas interna y externa (panel A), al igual que había sucedido al analizar cada una de las fracciones aisladas. Las secciones de PAO1 incubadas sólo con el anticuerpo secundario (panel D), demostraron la especificidad de la detección. Al incubar las secciones de PAO1 con los anticuerpos específicos para di/trimetil-lisina se obtuvo un patrón de marcaje similar al obtenido anti-EF-Tu, detectando a este epítipo tanto en el citoplasma como en ambas membranas (panel B). En este caso, para demostrar la especificidad de la unión, utilizamos como control secciones de células del mutante deficiente en EftM incubadas con los mismos anticuerpos que las secciones de PAO1 (panel E). Finalmente, incubamos secciones de células de la cepa PAO1 pUCP18ApGw(*eftM*) para localizar el enzima EftM mediante el uso de anticuerpos anti-FLAG. Tal como se observa en el panel C, el enzima EftM se localizó, principalmente, en el

citoplasma, aunque también se pudo detectar en la envoltura bacteriana. El control, secciones de PAO1, no reaccionó con el anticuerpo anti-FLAG (panel F).

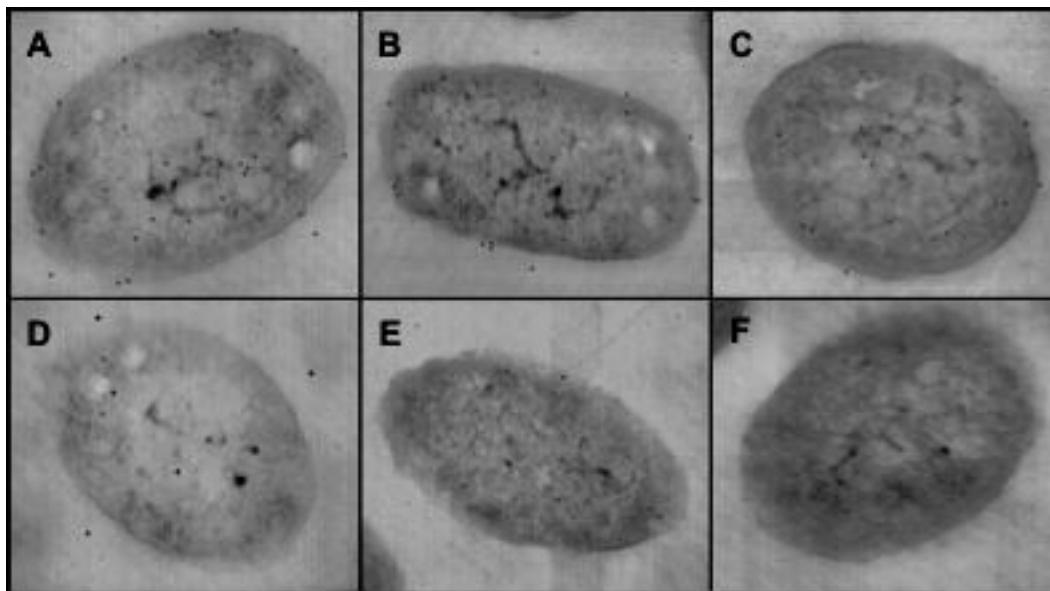


Figura 23. Localización de EF-Tu modificado y EftM por inmunomicroscopía electrónica. La figura muestra fotografías de microscopía electrónica de transmisión representativas de secciones de la cepa PAO1 (paneles A, B, D, F), la cepa PAO1 pUCP18ApGw(*eftM*) (panel C) o el mutante PAO1 Δ *eftM* (panel E) incubadas con anticuerpos específicos para EF-Tu (panel A), para di/trimetil-lisina (paneles B y E), para FLAG (paneles C y F) o sin anticuerpo primario (panel D). Los anticuerpos primarios fueron detectados con anticuerpos secundarios marcados con bolas de oro coloidal de 20nm de diámetro.

5.5 La trimetilación de EF-Tu contribuye a la invasión de *P. aeruginosa* y a la trans migración de queratinocitos polarizados.

Según los resultados de Barbier y colaboradores, la modificación del residuo 5 de lisina de la proteína EF-Tu con tres grupos metilo media la entrada de *P. aeruginosa* en las células del tracto respiratorio (Barbier et al., 2013). Para determinar si la trimetilación de EF-Tu también es esencial para la interacción del microorganismo con los queratinocitos de piel humanos, la cepa parental PAO1 y su mutante derivado deficiente en EftM, PAO1 Δ *eftM*, el cual es incapaz de modificar EF-Tu, se crecieron a temperatura ambiente, se incubaron con queratinocitos polarizados y se comparó su capacidad de entrar y atravesar células HaCaT crecidas sobre insertos como modelo *in vitro* de queratinocitos de piel polarizados.

En cada uno de los puntos de tiempo ensayados, PAO1 entró en las células más eficientemente que el mutante PAO1 Δ *eftM* (figura 24A). Después de 4 horas de infección, el mutante PAO1 Δ *eftM* fue incapaz de cruzar la barrea epitelial mientras que al menos 100

Resultados

bacterias de PAO1 transmigraron de la cámara apical a la basal (figura 24B). De forma parecida, después de 6 horas de infección la habilidad de atravesar las células de la cepa salvaje PAO1 era 100 veces superior a la mutante PAO1 Δ *eftM*. No hubo diferencias en la liberación de lactato deshidrogenasa entre los cultivos de queratinocitos estimulados con PBS o con cada una de las cepas bacterianas (figura 24C), confirmando que la alteración de la integridad de la barrera del epitelio no se debía a la citotoxicidad. Estos resultados sugieren que la trimetilación de EF-Tu está involucrada en el paso de *P. aeruginosa* a través de un modelo *in vitro* de queratinocitos de piel polarizados.

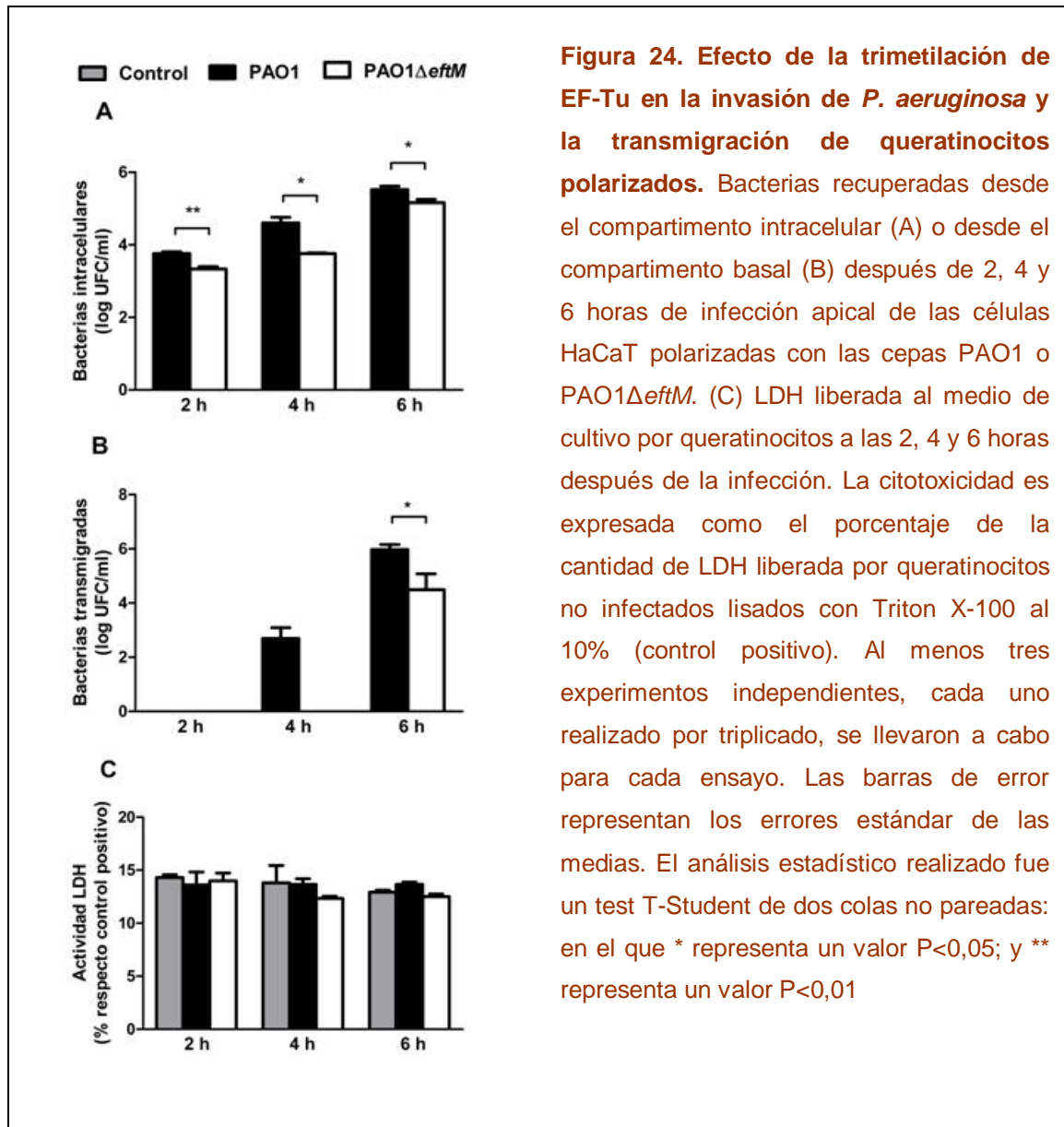
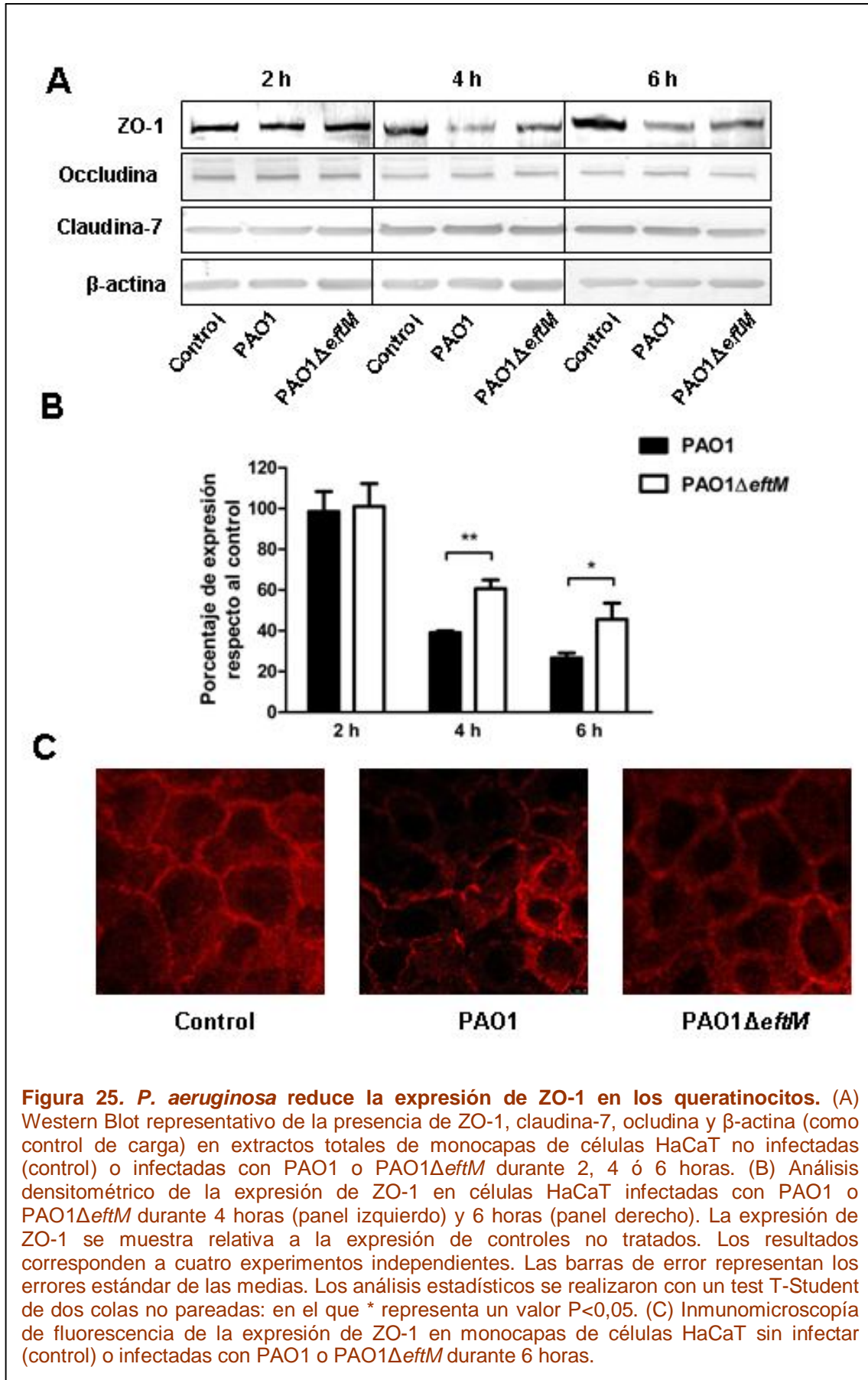


Figura 24. Efecto de la trimetilación de EF-Tu en la invasión de *P. aeruginosa* y la trans migración de queratinocitos polarizados. Bacterias recuperadas desde el compartimento intracelular (A) o desde el compartimento basal (B) después de 2, 4 y 6 horas de infección apical de las células HaCaT polarizadas con las cepas PAO1 o PAO1 Δ *eftM*. (C) LDH liberada al medio de cultivo por queratinocitos a las 2, 4 y 6 horas después de la infección. La citotoxicidad es expresada como el porcentaje de la cantidad de LDH liberada por queratinocitos no infectados lisados con Triton X-100 al 10% (control positivo). Al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado, se llevaron a cabo para cada ensayo. Las barras de error representan los errores estándar de las medias. El análisis estadístico realizado fue un test T-Student de dos colas no pareadas: en el que * representa un valor $P < 0,05$; y ** representa un valor $P < 0,01$

5.6 *P. aeruginosa* induce cambios en la expresión de ZO-1 de los queratinocitos.

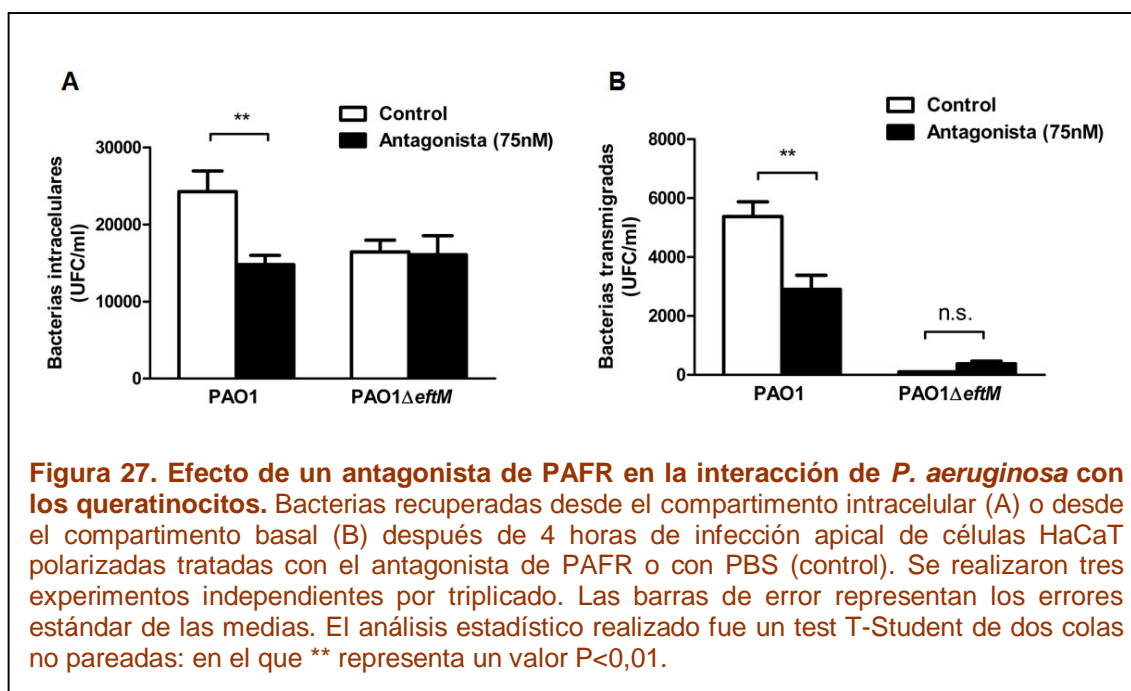
Para testar el efecto de *P. aeruginosa* con EF-Tu modificado sobre el epitelio, se midió la permeabilidad paracelular de células HaCaT polarizadas estimuladas con bacterias. Después de 6 horas de estimulación con PAO1, la permeabilidad paracelular había aumentado un 255% \pm 24.4% y sólo un 169.7% \pm 7.1% tras la estimulación con PAO1 Δ *eftM*, en comparación con células control no infectadas (figura 25A). Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de queratinocitos polarizados que eran expuestos a la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* mostraron alteración de las uniones intercelulares (figura 25B) y, en muchos casos, se observaron bacterias en las brechas entre células (figura 25C). Estas roturas de las uniones intercelulares no se observaron en las células no infectadas (datos no mostrados). Decidimos investigar si la alteración de las uniones intercelulares inducida por *P. aeruginosa* estaba asociada con cambios en la expresión de componentes del epitelio involucrados en el mantenimiento de la integridad de la barrera como las proteínas de las uniones estrechas Zonula Occludens-1 (ZO-1), claudina 7 y ocludina.

El análisis por Western Blot demostró una marcada reducción de ZO-1, pero no de la claudina 7 ni de la ocludina después de la exposición de queratinocitos a *P. aeruginosa* (figura 26A y 26B). Esta reducción fue detectada después de 4 y 6 horas de infección y era más pronunciada en los queratinocitos infectados con la cepa salvaje que con la mutante en *eftM* (figura 26B). La inmunomicroscopía de fluorescencia reveló que el patrón de cinturón continuo que forma la tinción de ZO-1 en la capa de células no estimuladas (figura 26C, control) fue alterado y se detectaba como una señal interrumpida en las uniones intercelulares después de 4 horas de infección con *P. aeruginosa*. Como ocurre en el análisis por Western Blot, percibimos que la señal de ZO-1 en las uniones intercelulares en los queratinocitos infectados con PAO1 estaba más alterada que en los queratinocitos infectados con PAO1 Δ *eftM* (figura 26C).

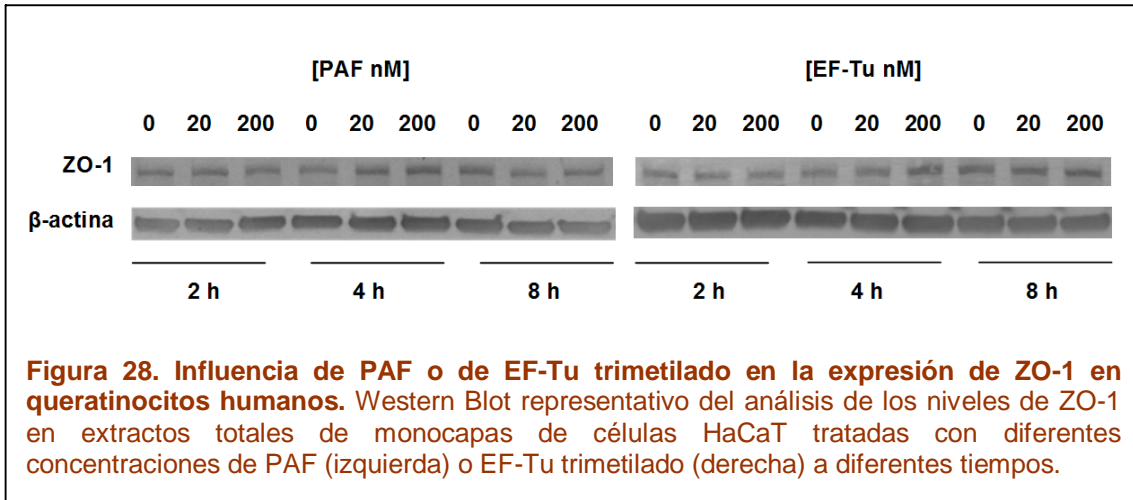


5.7 Contribución de PAFR en la transmigración de *P. aeruginosa* a través de los queratinocitos.

En un trabajo anterior demostramos que la trimetilación del residuo 5 de lisina de EF-Tu mimetiza el factor activador de plaquetas (PAF) y media la interacción de *P. aeruginosa* con las células del epitelio respiratorio a través del receptor del PAF (PAFR) (Barbier et al., 2013). Para investigar si la trimetilación de EF-Tu media la invasión y la transmigración de *P. aeruginosa* a través del PAFR en los queratinocitos, llevamos a cabo ensayos de invasión y transmigración bacteriana con células HaCaT polarizadas tratadas con un antagonista del PAFR (figura 27). El antagonista del PAFR disminuyó en un 40% la invasión y la transmigración de PAO1. Por el contrario, el tratamiento con el antagonista no tuvo efectos sobre el mutante, sugiriendo que la interacción de EF-Tu modificado con PAFR es específica y crítica tanto para la invasión como para la transmigración de *P. aeruginosa*.

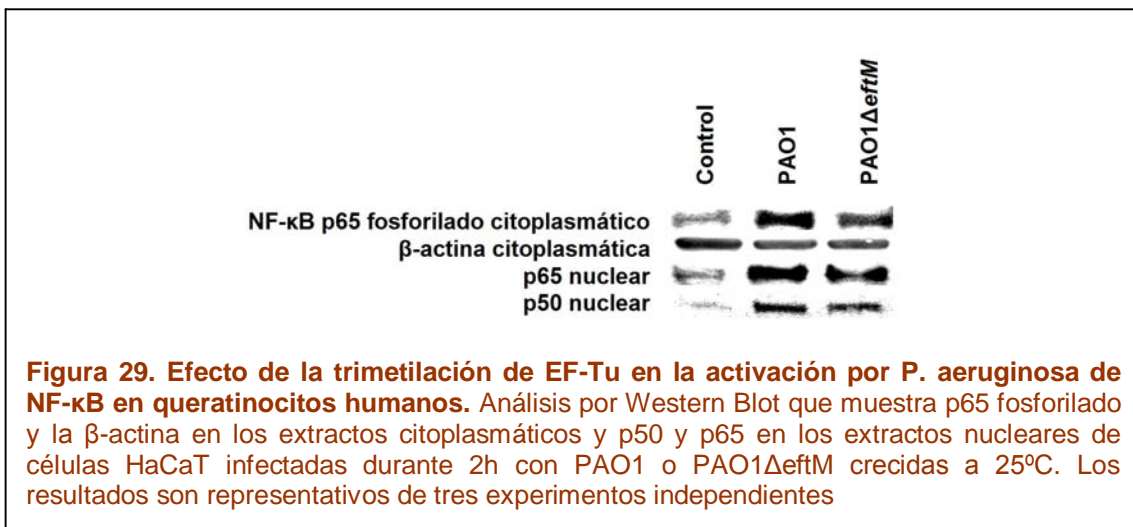


A continuación, investigamos si PAF o la trimetilación de EF-Tu afectaban a la expresión de ZO-1. Para ello, analizamos por Western Blot los extractos totales de células HaCaT tratadas durante 2-8h con un amplio rango de concentraciones de cada molécula. Ni el PAF, ni EF-Tu trimetilado alteraron la expresión de ZO-1 en ninguna de las condiciones ensayadas (figura 28). En resumen, estos resultados sugieren que la alteración de las uniones intercelulares y el incremento de la permeabilidad paracelular está relacionada con la entrada de *P. aeruginosa* en los queratinocitos más que con un efecto directo de la trimetilación de EF-Tu sobre PAFR.



5.8 La activación de NF-κB es necesaria para la alteración de la barrera epitelial inducida por *P. aeruginosa*.

Se sabe que TNF-α e IL-1β, debilitan la barrera que forma el epitelio de la córnea afectando a la localización de ZO-1 a través de NF-κB. La entrada de *P. aeruginosa* en las células del epitelio respiratorio activa el factor de transcripción NF-κB, por lo que hipotetizamos que la reducción de la producción de ZO-1 por queratinocitos tras la entrada de *P. aeruginosa* podría estar mediada por la activación de NF-κB. Para investigar esta hipótesis, determinamos si PAO1 y PAO1Δ*eftM* activaban NF-κB en las células HaCaT. El análisis por inmunoblot de los extractos citoplasmáticos de células infectadas con *P. aeruginosa* detectaron la fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB, proceso ligado a la activación de este factor de transcripción. Además, la subunidad p50 de NF-κB, la cual es translocada al núcleo tras la activación de NF-κB, también fue detectada en los extractos nucleares de células infectadas. Los niveles de ambos, p50 nuclear y p65 fosforilado del citoplasma, eran superiores en las células infectadas con PAO1 que en las infectadas con el mutante (figura 29), lo que se correlaciona con su habilidad para entrar en las células HaCaT.



Resultados

Para investigar la posible alteración del epitelio a través de NF- κ B por *P. aeruginosa*, utilizamos el inhibidor específico de NF- κ B ácido cafeico fenil ester (CAPE). El tratamiento con este inhibidor bloqueó la reducción de la proteína ZO-1 inducido por *P. aeruginosa* en células HaCaT, pero no tuvo efectos en los niveles de claudina 7 (figura 30).

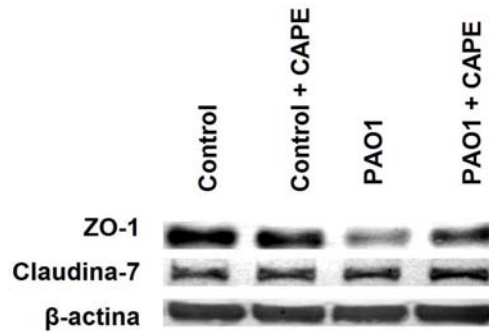


Figura 30. La activación de NF- κ B es necesaria para la alteración de la barrera epitelial por *P. aeruginosa*. Western Blot representativo del análisis de los niveles de ZO-1, claudina 7 y β -actina (como control de carga) en extractos totales de monocapas de células HaCaT incubadas con CAPE o PBS y dejadas sin infectar o infectadas con PAO1.

Además, la trans migración de *P. aeruginosa* también se redujo por tratamiento de células HaCaT con el inhibidor de NF- κ B CAPE (figura 31). No hubo diferencias significativas en la lactato deshidrogenasa liberada entre cultivos celulares de queratinocitos tratados con PBS o con CAPE, indicando que no hubo mayores efectos citotóxicos producidos por el inhibidor de NF- κ B.

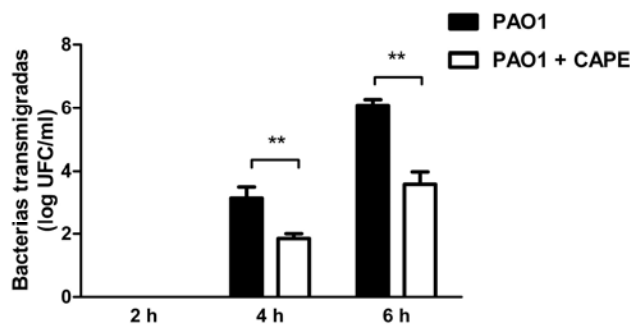
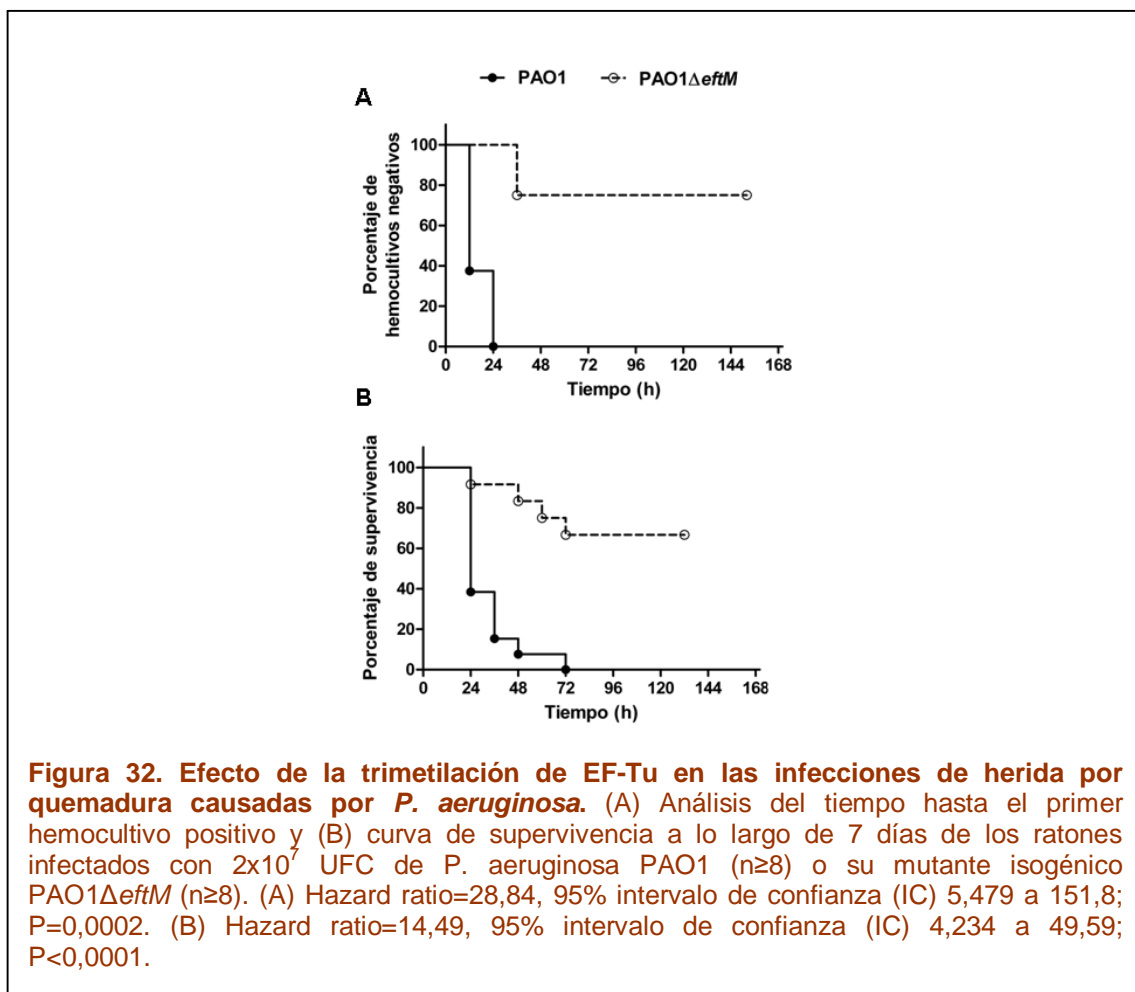


Figura 31. Trans migración de PAO1 a través de células HaCaT polarizadas. Bacterias recuperadas del compartimento basolateral después de 2, 4 y 6 h de infección apical de células HaCaT tratadas con CAPE o con PBS (control)

5.9 La modificación de EF-Tu es esencial en la patogénesis de *P. aeruginosa* en la infección de heridas por quemadura.

Para llegar a comprender el potencial impacto de la modificación de EF-Tu en la patogénesis de *P. aeruginosa* en la infección de heridas por quemadura, determinamos la habilidad del mutante deficiente en EftM para causar bacteremia y muerte en un modelo murino de infección de quemaduras. Para simular la fase inicial de la infección desde una fuente exógena, los animales fueron infectados con $2 \cdot 10^7$ UFC de PAO1 o PAO1 Δ eftM crecidas a 25°C. La medición del tiempo en el que los cultivos de sangre fueron positivos indicaron que todos los animales infectados con la cepa salvaje desarrollaron bacteremia antes de 24h, mientras que el desarrollo de bacteremia en ratones infectados con el mutante fue inusual (2 ratones (25%)) (figura 32A). El análisis de la supervivencia indicó que la bacteremia precedía 12-48h a la muerte, el 100% de los animales infectados con la cepa salvaje murieron antes del tercer día y la mayoría de muertes ocurrieron antes de 36h. Por el contrario, sólo 4 ratones (31%) de los infectados con el mutante murieron, y la muerte se produjo significativamente más tarde que en los ratones infectados con la cepa salvaje (figura 32B).



6 Discusión

Discusión

La fosforilcolina es un epítipo presente en una gran variedad de microorganismos, incluyendo tanto bacterias típicamente ambientales (*Actinomyces*, *Lactococcus spp.*, *Avibacterium paragallinarum*), como importantes patógenos humanos (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria spp.* y *Pasteurella multocida*). En la mayoría de los casos, la detección de este epítipo se ha realizado mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos (Calderon & Shennan, 1987; Chiang et al., 2013; Kolberg, Høiby, & Jantzen, 1997), pero son pocos los estudios en los que la presencia de fosforilcolina se haya demostrado mediante otras técnicas más precisas como la espectrometría de masas o la resonancia magnética nuclear (RMN).

El uso de estas técnicas ha permitido demostrar la presencia de fosforilcolina en el ácido teicoico y lipoteicoico presentes en la pared celular de *Streptococcus pneumoniae* (Vollmer & Tomasz, 2001), en el LPS de *Haemophilus influenzae* (Schweda et al., 2000), y en la proteína constituyente de los pili, tanto en *Neisseria meningitidis* (Jen, Jones et al., 2013), como en *Neisseria gonorrhoeae* (Hegge et al., 2004). En *S. pneumoniae* y *H. influenzae* la incorporación de fosforilcolina se da gracias a la información codificada por varios genes reunidos en los operones lic1ABCD1D2 y lic1ABCD, respectivamente. Estos genes codifican para proteínas implicadas en el metabolismo de la fosforilcolina, como una colina quinasa, un transportador de colina y una pirofosforilasa (Zhang et al., 1999). Por su parte, en *Neisseria meningitidis*, que fue la primera especie en la que se detectó la presencia de fosforilcolina asociada a una proteína (Warren & Jennings, 2003), es una única enzima, denominada transferasa de fosforilcolina a pilina codificada por el gen *pptA*, la encargada de incorporar este epítipo al pili.

En 1997 Weiser y colaboradores demostraron, mediante el uso de un anticuerpo específico para la detección de fosforilcolina (MAb TEPC-15), que *P. aeruginosa* presentaba fosforilcolina asociada a una proteína de 43 kDa que posteriormente nuestro grupo demostró que era el Factor de Elongación Tu (EF-Tu). Sin embargo, la incorporación de fosforilcolina a EF-Tu en *P. aeruginosa* no es llevada a cabo por el producto de un gen o genes homólogos a los descritos en *S. pneumoniae* o *H. influenzae*, ni tan siquiera homólogo al gen *pptA* de *Neisseria meningitidis*, sino que es debido a la acción del producto de un gen que denominamos *eftM* del inglés “Elongation factor Tu Modifying enzyme” y que atendiendo a los análisis informáticos codificaría, hipotéticamente, una metiltransferasa.

La identificación del gen *eftM* nos ha permitido generar un mutante a partir del cual se ha aislado EF-Tu recombinante, que ha sido comparado con EF-Tu recombinante aislado de la cepa parental. El análisis por espectrometría de masas de ambas proteínas solamente ha detectado un cambio puntual en el residuo de lisina 5 situado en el extremo N-terminal de la proteína. Curiosamente esta modificación no se corresponde con la incorporación del epítipo de fosforilcolina a dicho residuo, sino con la incorporación de tres grupos metilo, dando lugar a una estructura similar a la de la fosforilcolina. El grado de similitud de ambas estructuras es tan elevado que es reconocido por igual por el anticuerpo monoclonal MAb TEPC-15. Este hecho

debería hacer replantear la existencia del epítipo de fosforilcolina en aquellos microorganismos cuya presencia ha sido confirmada mediante el uso de anticuerpos específicos.

La sustitución del residuo de lisina 5 por alanina (sólo los residuos de lisina y, en raras ocasiones, arginina son susceptibles de ser trimetilados) conllevó la pérdida de reacción del anticuerpo antifosforilcolina lo que indica que, a pesar de que el análisis por espectrometría de masas de EF-Tu no cubrió la secuencia completa de la proteína, el único residuo que es modificado por EftM cuya modificación permite la reacción con MAb TEPC-15 es la lisina 5. Aunque la metilación de residuos de lisinas en proteínas superficiales bacterianas se observó ya en 1959, cuando Ambler y Rees detectaron la presencia de esta modificación en la flagelina de *E. coli* (Ambler & Rees, 1959), sorprendentemente se sabe muy poco del papel de esta modificación en la patogenicidad bacteriana. En este sentido, se han identificado proteínas superficiales metiladas en los residuos de lisina en *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium smegmatis*, en los que concretamente se han localizado mono y dimetil-lisinas en adhesinas responsables de la unión a laminina y heparina (Pethe et al., 2002). También se ha detectado la existencia de proteínas integrales de membrana que sufren metilación múltiple sobre residuos de lisina y arginina en *E.coli*, aunque el papel de la metilación es desconocido (Kehry & Dahlquist, 1982). En *Rickettsia prowazekii*, un patógeno intracelular obligado causante del tifus, también se ha descrito que la proteína de membrana externa OmpB está trimetilada en los residuos de lisina (Bechah et al., 2010). La trimetilación de esta proteína es esencial para la virulencia de este microorganismo, sin embargo se desconoce el mecanismo molecular de patogenicidad que subyace en la trimetilación de OmpB. A la vista de nuestros resultados, no es descabellado pensar que la trimetilación de OmpB podría facilitar la entrada de *R. prowazekii* en las células humanas a través de a través del PAFR, como ocurre en *P. aeruginosa* (Barbier et al., 2008).

El análisis de la secuencia de aminoácidos que se deduce del gen *eftM* sugiere que EftM es una metiltransferasa. Los resultados de los análisis por espectrometría de masas de la proteína EF-Tu recombinante aislada de distintos huéspedes corroboran esta hipótesis. En este sentido, nuestros datos demuestran claramente que EftM es capaz de llevar a cabo la transferencia de grupos metilo incluso en un sistema heterólogo como es *E. coli*. Los resultados del grupo de la Dra. Goldberg, que colabora con nosotros en esta línea de investigación, han demostrado de forma inequívoca que EftM es una metiltransferasa dependiente de adenosilmetionina (SAM) de clase I. En efecto, los ensayos *in vitro* realizados por este grupo con proteínas puras han determinado que el enzima EftM recombinante es suficiente para la trimetilación de EF-Tu de *P. aeruginosa* en presencia de SAM. También se ha determinado que la actividad de EftM *in vitro* es dependiente de la temperatura, siendo más activo a temperaturas inferiores a 28°C que a 37°C. Este resultado es consistente con el hecho de que todas las cepas de *P. aeruginosa*

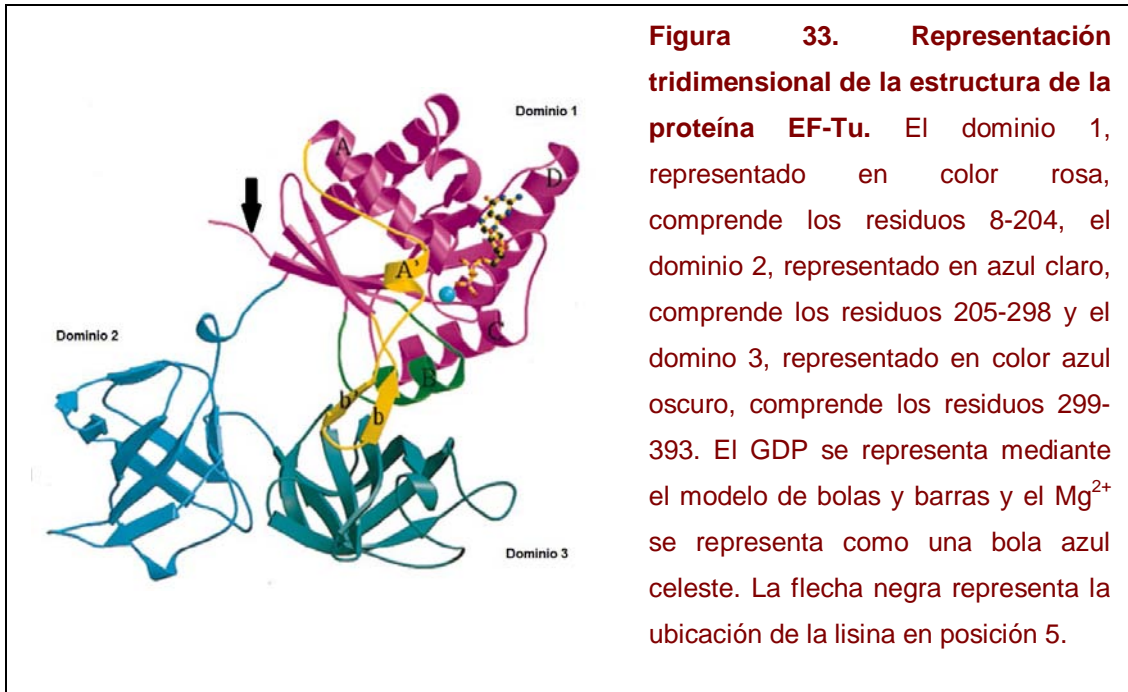
analizadas hasta la fecha trimetilan EF-Tu más eficientemente a 25°C que a 37°C (Barbier et al., 2008).

Para estudiar la conservación y distribución del enzima EftM entre distintas cepas de *P. aeruginosa*, se realizó un análisis comparativo entre la secuencia aminoacídica de la proteína EftM de PAO1 y los productos génicos de las 13 cepas de *P. aeruginosa* completamente secuenciadas contenidas en la base de datos de www.pseudomonas.com. El análisis mostró la presencia del enzima EftM en todas ellas y en la mayoría de cepas el grado de identidad de sus secuencias fue superior al 99 %. De ello se deduce que el enzima presenta una gran conservación intraespecífica. El caso de menor grado de identidad de secuencia, un 87,04 %, se dio con la cepa DK2, procedente de un aislamiento clínico, que se sabe presenta diversas deleciones en su genoma. Para averiguar la distribución del enzima EftM a nivel interespecífico, es decir entre especies diferentes, se comparó la secuencia aminoacídica de EftM de PAO1 con posibles homólogos en especies como *P. stutzeri*, *P. fulva*, *P. mendocina* y *P. syringae*, cuyos genomas se encuentran contenidos en la base de datos ya citada. En todos los casos se obtuvieron proteínas con unos valores de identidad de secuencia superiores al 70 %, anotadas en la base de datos como metiltransferasas o proteínas hipotéticas. Para determinar el grado de conservación del enzima EftM también entre diferentes géneros, se realizó un análisis por BLAST del que se obtuvo una gran distribución de homólogos entre otras gammaproteobacterias (incluyendo *Shewanella* sp.; *Halomonas* sp. y *Vibrio* sp.), así como *Firmicutes*. Por lo que se concluye que EftM es un enzima altamente conservado y ampliamente distribuido, incluso entre diferentes géneros.

Se desconoce qué función tienen estas proteínas homólogas a EftM en otras especies o géneros, o como afecta su actividad a la biología de estos microorganismos. Tampoco se sabe si EF-Tu se encuentra expuesto en la superficie de todos ellos o si presentan también trimetilación sobre esta proteína, excepto en el caso de *P. syringae*, típico patógeno de plantas, en el que EF-Tu es reconocido como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) que las células vegetales reconocen a través del receptor de EF-Tu (EFR) (Qiu et al., 2012). Este hecho sugiere que en este patógeno EF-Tu también se encuentra expuesto en la superficie. Además, se ha demostrado que es la región N-terminal de EF-Tu, más concretamente los primeros 18 aminoácidos, la que es reconocida por EFR para activar la respuesta defensiva en la planta (Kunze et al., 2004). Nuestros resultados demuestran que *P. syringae* pv. tomato DC3000, trimetila EF-Tu, por lo que sería interesante investigar como afecta esta modificación al reconocimiento del patógeno por parte de las células vegetales.

En *P. aeruginosa* la trimetilación de EF-Tu contribuye a la interacción con las células epiteliales del tracto respiratorio en los primeros estadios de la infección. Sin embargo, la principal función de EF-Tu es participar en el proceso de elongación en la síntesis de proteínas. EF-Tu representa entre el 5 y el 9 % del total de proteína celular y es una de las proteínas más

abundantes en bacterias. EF-Tu es una proteína altamente conservada, que interacciona con el ARN, con otras proteínas y nucleótidos (Filer & Furano, 1980) (figura 33).



Contiene tres dominios: el dominio I consta de un sitio de unión a nucleótidos (dominio GTPasa), que está altamente conservado. La interacción con el extremo 3' del aminoacil ARN de transferencia (aa-ARNt) se realiza entre los dominios I y II, y el extremo 5' del ARNt interacciona con el dominio III, por lo que habitualmente se dice que la función principal de EF-Tu es la del posicionamiento correcto del ARNt en el sitio A del ribosoma. EF-Tu alterna estados activos con inactivos. En el estado activo, EF-Tu une GTP y el complejo media la unión del ARNt al ribosoma. Este proceso se asocia con la hidrólisis de GTP, tras la cual, EF-Tu se mantiene unido a GDP, quedando en su forma inactiva y escapando del ribosoma.

Se sabe que EF-Tu está regulado por una gran variedad de modificaciones post-traduccionales, incluyendo la fosforilación, acetilación y la metilación. Se ha descrito previamente que la metilación de EF-Tu regula la translación en otros microorganismos (Kraal, Lippmann, & Kleanthous, 1999). Por ejemplo, se sabe que la metilación de EF-Tu en la lisina 56 causa una disminución de la actividad GTPasa dependiente de ARNt que podría suponer un retraso en el crecimiento bacteriano (L'Italien & Laursen, 1979). En *E. coli*, la fosforilación parece facilitar su liberación del ribosoma, lo que afectaría a la síntesis proteica. También se ha descrito la fosforilación de EF-Tu en el residuo 382 de treonina como consecuencia de la actividad de la toxina de un bacteriófago, que conlleva la inactivación de EF-Tu (Cruz et al., 2014) y en *M. tuberculosis* la fosforilación en múltiples lugares de EF-Tu reduce su interacción con el GTP (Sajid et al., 2011).

El análisis de los modelos tridimensionales de la proteína EF-Tu indica que la modificación que este trabajo ha descubierto, la trimetilación del residuo 5 de lisina, está localizada en la porción

expuesta en la superficie de la proteína, distante de los dominios de unión GTP/GDP o del ARNt, que son cruciales para la actividad de la proteína (Roy et al., 2007); por lo que inicialmente suponemos que no debería de afectar a su actividad en la síntesis proteica, aunque no se puede descartar la posibilidad de que la metilación de EF-Tu altere la acomodación del aminoacil-ARNt en el sitio A del ribosoma. Por ese motivo, aunque no hemos detectado diferencias significativas en las curvas de crecimiento y la cantidad total de proteínas por bacteria entre la cepa parental PAO1 y el mutante deficiente en EftM, no se puede excluir la posibilidad de que existan diferencias de expresión de proteínas específicas entre cepas que presentan o no la EF-Tu modificada.

En el presente estudio se han utilizado técnicas inmunológicas para localizar el enzima EftM y averiguar la ubicación celular en la que lleva a cabo la modificación de EF-Tu. Como era de esperar se ha detectado EF-Tu en el citoplasma, pero también en las envolturas bacterianas, donde ya había sido detectada previamente (Barbier et al., 2008; Kunert et al., 2007). Además, en este trabajo hemos demostrado que la región N-terminal está expuesta hacia el exterior, gracias a la detección específica del residuo 5 de lisina situado en esa región.

La presencia de EF-Tu en las envolturas no debe extrañar, puesto que también se ha documentado en otros microorganismos como *Acinetobacter baumannii* (Dallo et al., 2012), *Mycoplasma pneumoniae* (Balasubramanian et al., 2008; Dallo et al., 2002), *Mycobacterium tuberculosis* (Xolalpa et al., 2007), *Francisella tularensis* (Barel et al., 2008) y *Mycobacterium leprae* (Marques et al., 1998). De hecho, cabe destacar que la proteína EF-Tu en su secuencia contiene más de un 40% de aminoácidos hidrofóbicos, motivo que apoya su localización en la membrana.

La localización externa de EF-Tu ha hecho que sea considerada una proteína “moonlighting”. Este término define a las proteínas a las que se les ha atribuido nuevas funciones además de la ya conocida, y que en muchos casos, están relacionadas con la virulencia bacteriana (Henderson & Martin, 2013). Algunas funciones “moonlighting” que se han asignado a EF-Tu comprenden la de actuar como chaperona en respuesta al estrés bacteriano (Caldas et al., 1998), actuar como adhesina en *Mycoplasma pneumoniae* (Balasubramanian et al., 2008; Dallo et al., 2002), *P. aeruginosa* (Barbier et al., 2013), *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus johnsonii* (Granato et al., 2004; Ramiah et al., 2008), mediar la invasión de *Francisella tularensis* en monocitos por su interacción con la nucleolina (Barel et al., 2008) y conferir resistencia al complemento gracias a la unión de factor H y plasminógeno en *P. aeruginosa* (Kunert et al., 2007).

El mecanismo por el que EF-Tu se dirige y se inserta en la membrana externa de *P. aeruginosa* es totalmente desconocido. EF-Tu carece de péptido señal como las típicas proteínas de membrana externa bacterianas lo que implica que utiliza otra/s vía/s. Es posible que existan chaperonas que faciliten la inserción de EF-Tu en la membrana, dado que la existencia de secuencias gemelas de arginina que son reconocidos por la translocasa TAT (del inglés

Tween-Arginine Translocation), que media la inserción de proteínas en la membrana están descartadas en EF-Tu. La trimetilación del residuo 5 de lisina no puede considerarse un marcador de direccionamiento de EF-Tu a la membrana, puesto que nuestro grupo, detectó la presencia de EF-Tu en la superficie celular tanto a 25, como a 37°C, temperatura a la que la trimetilación de EF-Tu es mínima (Barbier et al., 2008). Además, la presencia de EF-Tu en las membranas de *P. aeruginosa* como proteína de unión al factor H y al plasminógeno, ensayo llevado a cabo a 37°C, descarta la posibilidad de que la trimetilación sea un indicador de transporte hasta la membrana (Kunert et al., 2007).

Nuestros datos indicaron que EF-Tu es trimetilado en el citoplasma, lo que sugería que esa sería también la ubicación del enzima EftM. En efecto, se localizó EftM en el citoplasma, pero también en las membranas, lo cual estaba en consonancia con el hecho de que se hubiera detectado EF-Tu trimetilado en las envolturas. Desconocemos el mecanismo por el cual el enzima EftM alcanza las membranas, pero el análisis de su secuencia aminoacídica podría sugerir un posible transporte mediante el sistema TAT, ya que aunque la proteína no presenta exactamente la secuencia consenso típica de las proteínas transportadas por esta vía, S/TRRXFLK, sí que presenta gemelos de arginina, RR, próximos al extremo N-terminal, que es la ubicación habitual que presentan las proteínas transportadas a través de esta vía. Además, casi el 40 % de los aminoácidos que componen la proteína son hidrofóbicos, lo cual es coherente con los resultados obtenidos en este trabajo acerca de su ubicación en las membranas. No es la primera vez que se describe la presencia de una metiltransferasa en las membranas celulares, de hecho en *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium smegmatis*, la metiltransferasa responsable de la incorporación de grupos metilo a residuos de lisina de las adhesinas superficiales, también se ha ubicado en la membrana (Pethe et al., 2002). Hay que mencionar que la detección de EftM en las envolturas bacterianas también podría ser fruto de un artefacto ya que, en realidad, nuestros experimentos, al carecer de anticuerpos específicos contra la enzima, detectaron EftM recombinante fusionada al péptido FLAG y sobrexpresada por el vector de expresión. Es posible que la forma nativa de EftM no esté presente en las envolturas de *P. aeruginosa*. Sin embargo, no hay ninguna duda sobre la presencia de EftM en el citoplasma dado que se ha detectado EF-Tu trimetilado en él.

La trimetilación de EF-Tu media la interacción de *P. aeruginosa* con las células epiteliales respiratorias a través de PAFR dada sus similitud con el ligando natural de este receptor (Barbier et al., 2013). Esta interacción se da principalmente cuando el microorganismo ha crecido a temperaturas inferiores a 28°C, que es cuando *P. aeruginosa* modifica de forma más eficiente EF-Tu. Este hecho sugiere que la interacción EF-Tu trimetilado-PAFR es clave en los primeros momentos de la infecciones por *P. aeruginosa* desde una fuente exógena.

P. aeruginosa es el principal patógeno gram negativo detectado en las infecciones de heridas por quemaduras. En este estudio hemos caracterizado la contribución de EF-Tu trimetilado en

la interacción de este patógeno con las primeras células con las que el microorganismo va a interactuar en estas infecciones, los queratinocitos de la piel. Para ello las células han sido crecidas en insertos con filtros cubiertos por colágeno y fibronectina, intentando simular la hipodermis, y favoreciendo su desarrollo polarizado. Este modelo es más representativo de la epidermis que el uso de monocapas celulares puesto que los queratinocitos en la piel se encuentran estratificados y debido a la presencia de uniones intercelulares, que impiden la libre movilidad de lípidos y proteínas por la membrana, se diferencian en ella tres zonas cuya composición es diferente: una porción apical, una lateral y otra basal. Este hecho podría ser clave en los estudios de las interacciones patógeno-epitelio dado que según Lee y colaboradores, que realizaron experimentos de infección por *P. aeruginosa* sobre células del epitelio respiratorio crecidas sobre insertos, la composición de la membrana apical confiere resistencia a la infección, siendo muy poco frecuente encontrar bacterias unidas a esta membrana, pero es muy habitual encontrarlas cerca de los huecos entre células y en zonas con lesiones. Además, sus estudios sugieren que la citotoxicidad requiere de una interacción directa con la membrana basolateral (Lee et al., 1999). En su conjunto, la información que se puede obtener en el estudio patógeno-hospedador con el uso de cultivos polarizados es más real que la que se puede obtener con cultivos en monocapa, además de permitir el estudio de la trans migración bacteriana a través del epitelio.

En esta tesis se ha utilizado como modelo de epitelio cutáneo la línea de queratinocitos humanos HaCaT. El uso de esta línea de queratinocitos inmortalizados espontáneamente (Boukamp et al., 1988) en lugar de queratinocitos primarios supone una serie de ventajas, como la disponibilidad celular ilimitada, además de evitar la variabilidad genética y morfológica interindividual. Cuando las células HaCaT alcanzan la confluencia inician un proceso de especialización que incluye la formación de uniones estrechas, proceso que se ve favorecido por tiempos de cultivo prolongados y que puede acelerarse gracias al aumento de la concentración de calcio en el medio de cultivo (Walker et al., 2006). Cuando las células establecen uniones entre ellas entran en la fase G0 del ciclo celular, de forma que detienen su proliferación (Walker et al., 2006). Las uniones estrechas son las principales responsables de mantener la integridad de la barrera epitelial. En otras líneas celulares el establecimiento de estas uniones estrechas viene marcado por un incremento importante en la resistencia eléctrica transepitelial (RET). En este aspecto, en nuestros estudios la línea celular HaCaT ha mostrado un incremento gradual de la RET durante el proceso de crecimiento sobre el inserto hasta alcanzar un valor máximo de unos $30\Omega\cdot\text{cm}^2$ similares a los ya documentados por otros autores para estas células (Aono & Hirai, 2008; Meyle et al., 1999). Este valor es bajo comparado con los documentados para otras células epiteliales como por ejemplo la línea broncoepitelial 16HBE14o-, capaz de alcanzar valores superiores a los $900\Omega\cdot\text{cm}^2$ (Aono & Hirai, 2008; Meyle et al., 1999), aunque ello no significa que las células HaCaT no estén formando un verdadero epitelio estanco. Una prueba de la integridad epitelial se deduce de la impermeabilidad de las HaCaT a la fluoresceína y de los datos de trans migración bacteriana conseguidos, puesto que la presencia de huecos intercelulares no permitiría ver diferencias entre la trans migración de la

cepa PAO1 y del mutante deficiente en *effM*. Además, la formación de estas uniones estrechas también ha sido confirmadas, tanto en este trabajo como en estudios previos, mediante la utilización de imágenes de inmunomicroscopía (Tebbe et al., 2002).

Nuestros resultados han demostrado que el mutante deficiente en la trimetilación de EF-Tu entra de forma menos eficiente que la cepa parental en los queratinocitos al igual que sucedía en las monocapas de epitelio respiratorio (Barbier et al., 2013). Además, la cepa parental es más eficiente atravesando el epitelio cutáneo que el mutante en *effM*. Esta mayor capacidad de trans migración de la cepa parental es debida a la alteración de la permeabilidad paracelular del epitelio. De esta forma, la penetración del epitelio cutáneo por *P. aeruginosa* parece seguir mayoritariamente una ruta paracelular y no transcelular, aunque nuestros resultados no permiten descartar de forma concluyente esta última vía.

Una vez determinada que la vía paracelular era la más relevante en la trans migración de *P. aeruginosa* a través del epitelio cutáneo, se decidió estudiar el estado de las uniones estrechas, como responsables principales del mantenimiento de la integridad epitelial. De forma general, los microorganismos han desarrollado 4 estrategias para actuar sobre este tipo de uniones. Una primera estrategia es la adoptada por algunos patógenos extracelulares que secretan enzimas que modifican o rompen los componentes de las uniones; un ejemplo sería el caso de *Clostridium perfringens* que produce una enterotoxina que degrada la claudina 3 y 4 (Sonoda et al., 1999). Una segunda opción adoptada por algunos patógenos es la de producir toxinas que son endocitadas por las células, atacándolas desde el interior; por ejemplo *Clostridium difficile*, patógeno intestinal que produce las toxinas A y B, las cuales en el interior de la célula eucariota glucosilan pequeñas GTPasas (Rac, Cdc42 y Rho), lo que conlleva una disociación de las proteínas ocludina, ZO-1 y ZO-2, aumentando la permeabilidad del epitelio (Chen et al., 2002; Nusrat et al., 2001). En tercer lugar, otros microorganismos optan por inyectar directamente en la célula eucariota factores que desestabilizan las uniones, cómo podría ser el caso de *E. coli* enterohemorrágica, que tiene la capacidad de inyectar vía un sistema de secreción de tipo III un efector llamado Tir, cuya función es la de insertarse en la membrana de la célula huésped y servir de receptor para la adhesión de la bacteria (Garmendia et al., 2004) y además conecta por su región intracelular con proteínas de dinamización de la actina (Gruenheid & Finlay, 2003), provocando la redistribución de ZO-1 y ocludina y la fosforilación de la miosina (Muza-Moons et al., 2003; Muza-Moons et al., 2004; Simonovic et al., 2000). Y finalmente, algunos microorganismos se adhieren o invaden las células y, de forma directa afectan al citoesqueleto o modulan una serie de eventos intracelulares que provocan la desregulación de las uniones celulares. Independientemente de la estrategia utilizada, el resultado final es la redistribución y/o disminución de las proteínas de unión intercelular y, en consecuencia, apertura de las uniones intercelulares e incremento de la permeabilidad paracelular.

Hasta el momento, no nos consta que haya trabajos en la literatura científica en los que se haya investigado el efecto de *P. aeruginosa* sobre las proteínas de las uniones estrechas en la línea de queratinocitos humanos HaCaT, aunque sí se han publicado resultados en otras líneas celulares epiteliales, principalmente respiratorias. Además, la mayoría de estudios realizados acerca de la influencia de *P. aeruginosa* sobre la integridad de la barrera epitelial, y concretamente sobre las uniones estrechas, se han llevado a cabo utilizando componentes bacterianos puros, y en pocas ocasiones utilizando bacterias enteras.

En los estudios realizados con componentes bacterianos aislados, se han estimulado las células del epitelio corneal (Yi et al., 2000) o epitelio respiratorio (Eutamene et al., 2005) con LPS, obteniendo en ambos casos un aumento de la permeabilidad paracelular y concretamente en el epitelio ocular, una reducción de los niveles de las proteínas de las uniones estrechas, ZO-1 y ZO-2.

La elastasa es el componente de *P. aeruginosa* que ha sido más utilizado como estímulo para estudiar la alteración de la permeabilidad epitelial. En la línea celular de células de riñón MDCK reduce los niveles de las proteínas ZO-1 y ZO-2 (Azghani, 1996), en las células del epitelio nasal humano reduce los niveles de las proteínas ocludina, claudina 1 y 4 (Nomura et al., 2014) mientras que en el epitelio bronquial causa la reducción de ocludina y ZO-1 en las membranas y reorganización de la actina citoplasmática (Azghani et al., 1993; Clark et al., 2011). En el epitelio cutáneo la elastasa también provoca aumento de la permeabilidad paracelular (Azghani et al., 2000). La elastasa además provoca en el endotelio la rotura proteolítica de la VE-cadherina, lo que conlleva retracción celular, que favorece el acceso de la bacteria a la región basolateral, donde su capacidad invasiva es mayor (Golovkine et al., 2014).

Los ramnolípidos también provocan la alteración de las uniones intercelulares del epitelio respiratorio y aumentan la permeabilidad paracelular (Zulianello et al., 2006), al igual que ocurre en el caso de las células intestinales Caco-2 (Wallace et al., 2014).

Otra molécula de la que se ha ensayado su efecto es la acil homoserina lactona, 3O-C12-HSL, molécula implicada en la señalización intercelular bacteriana (quórum sensing). Se ha descrito que esta molécula provoca la reducción y deslocalización de las proteínas de las uniones estrechas ZO-1, ZO-3, JAM-A, ocludina, tricelulina, así como una reorganización de la F-actina en células Caco-2 (Eum et al., 2014; Vikström et al., 2010; Vikström et al., 2006). La lectina PA-I, adhesina de *P. aeruginosa*, también provoca un incremento en la permeabilidad paracelular en células Caco-2 (Laughlin et al., 2000).

El compendio de estos resultados indica que son varios los componentes de *P. aeruginosa* que son capaces de alterar las uniones intercelulares afectando a distintas proteínas que mantienen la integridad del epitelio. Sin embargo, estos estudios no representan la mejor aproximación metodológica para el estudio de la alteración de la permeabilidad epitelial por *P. aeruginosa*, alejándose de la realidad biológica al utilizar componentes puros, en muchos casos a concentraciones irrelevantes *in vivo*.

En la literatura científica sólo hemos encontrado dos estudios sobre el efecto de *P. aeruginosa*, como bacteria, sobre las uniones estrechas epiteliales. El primero demostró que la infección de células broncoepiteliales por *P. aeruginosa* producía una reducción en las proteínas de unión intercelular, y en consecuencia, un aumento en la permeabilidad del epitelio. Según este estudio, una gran parte de la capacidad bacteriana para atravesar el epitelio polarizado se debería a las toxinas secretadas mediante el SST3 (Soong et al., 2008). El segundo estudio, realizado con células de riñón MDCK, demostró que *P. aeruginosa* inyecta ExoS al interior celular, desencadenando una cascada de acontecimientos que conlleban la reducción de la expresión de las proteínas ZO-1 y ocludina, y por tanto, el incremento de la permeabilidad paracelular (Okuda et al., 2010).

En conjunto, los resultados descritos hasta la fecha acerca de las proteínas que se ven alteradas por la infección por *P. aeruginosa*, varían en función de la línea celular seleccionada, dependiendo de si la estimulación se realiza con componentes puros o bacterias completas y según el sistema de detección utilizado. De forma general se puede decir que *P. aeruginosa* provoca en las células epiteliales deslocalización y/o reducción de las proteínas de las uniones estrechas, lo que supone un incremento de la permeabilidad paracelular.

En este trabajo se han analizado algunas proteínas constituyentes de las uniones estrechas, concretamente: ZO-1, ocludina y claudina 7, de las cuales, sólo en la primera de ellas se ha observado una reducción del contenido total como consecuencia de la infección por *P. aeruginosa*. La reducción observada en los niveles de ZO-1 no puede atribuirse a la muerte celular ocasionada por la bacteria, puesto que la determinación de la actividad lactato deshidrogenasa no muestra diferencias entre ambas cepas, ni respecto al control. Además, el hecho de que otras proteínas integrantes de las uniones estrechas no se hayan visto alteradas (occludina y claudina 7) indica que el efecto sobre ZO-1, no es consecuencia de la citotoxicidad.

Tanto por los resultados del presente trabajo como por los encontrados en la bibliografía, se deduce que una de las proteínas más susceptibles a sufrir trastornos durante la interacción con *P. aeruginosa* o alguno de sus componentes es ZO-1. Este efecto, casi selectivo, puede ser debido a la ubicación apical en la membrana lateral de ZO-1, por lo que constituyen la primera barrera con la que se encuentra la bacteria al intentar atravesar por el espacio paracelular y, por tanto, posiblemente sea una de las proteínas de unión intercelular que se vea afectada de forma más temprana. Esta misma "teoría" la proponen Ohnemus y colaboradores, quienes realizaron experimentos de infección con *Staphylococcus aureus* en queratinocitos, obteniendo una redistribución de las proteínas ZO-1 y ocludina, mientras que la E-cadherina y la actina no se vieron alteradas. Estos autores proponen que la pérdida de uniones intercelulares es un proceso tiempo-dependiente, de forma que en primer lugar se produce la deslocalización de ZO-1 de las uniones estrechas, a continuación se reducen las claudinas y la ocludina, posteriormente se pierden las uniones adherentes (E-cadherina y β -catenina) y finalmente tiene lugar la pérdida de los desmosomas (Ohnemus et al., 2008). Para explicar este proceso se puede hacer un símil en el que las uniones intercelulares se abren como si de una cremallera

se tratasen, a medida que las bacterias avanzan desde las uniones estrechas, de ubicación apical, hasta llegar a los desmosomas, ubicados en la zona basolateral. En nuestros estudios no hemos observado cambios en la expresión de la oludina o la claudina 7, pero, atendiendo a la teoría de Ohnemus, si hubiéramos realizado estimulaciones a tiempos más largos quizás hubiéramos detectado cambios en estas proteínas de unión intercelular.

La trimetilación del residuo de lisina 5 de EF-Tu mimetiza la fosforilcolina, que es el ligando natural del PAFR, por lo tanto, es lógico pensar que la reducción de la expresión de ZO-1, con el consecuente incremento de la permeabilidad paracelular y la mayor capacidad de trans migración que presenta la cepa parental respecto al mutante deficiente en EftM estuviera mediada por la interacción EF-Tu trimetilado-PAFR. En este sentido, los experimentos con un antagonista de PAFR lograron reducir la trans migración de la cepa parental pero no tuvieron ningún efecto sobre el mutante, lo que apoya nuestra hipótesis. Sin embargo, ni el ligando natural de PAFR, PAF, ni EF-Tu trimetilado purificado tuvieron ningún efecto sobre los niveles de ZO-1 de las células HaCaT. Este resultado está en desacuerdo con los resultados obtenidos con Knezevic y colaboradores que describieron un aumento de la permeabilidad del endotelio, debido a una redistribución de ZO-1, al ser estimulado con PAF ([Knezevic et al., 2009](#)). Estos resultados contradictorios pueden deberse a que los queratinocitos no respondan igual que las células endoteliales a PAF.

Ante estos resultados nos planteamos que la disminución de los niveles de ZO-1 que *P. aeruginosa* provoca en las células HaCaT es debida a la inducción de señales intracelulares inducidas tras la interacción del microorganismo con la célula. De esta manera, el antagonista de PAFR reduce específicamente la trans migración de la cepa parental, que presenta EF-TU trimetilado, porque bloquea, parcialmente, la interacción de esta cepa con las células, mientras que no tiene ningún efecto sobre la trans migración del mutante, dado que no afecta a su capacidad de interacción. En este sentido, hay que señalar que el mutante también es capaz de reducir los niveles de ZO-1, aunque en menor medida que la cepa parental, dado que su capacidad de interacción con las células HaCaT se ve reducida por la ausencia de la trimetilación de EF-Tu.

Es bien conocido que la entrada de *P. aeruginosa* en las células epiteliales respiratorias activa el factor de transcripción NF- κ B ([Schwarzer et al., 2008](#)) y que la activación de este factor por agonistas naturales como TNF- α e IL-1 β ([De Simone et al., 2014](#); [Tesoriere et al., 2014](#)), debilitan la función barrera que ejerce el epitelio afectando a la localización de ZO-1. Con todos estos indicios, nos planteamos la hipótesis de que la reducción de ZO-1 observada en queratinocitos tras la infección por *P. aeruginosa* estaba mediada por la activación de NF- κ B. Nuestros resultados han demostrado claramente que la reducción de ZO-1 inducida por *P. aeruginosa* y la consecuente trans migración bacteriana es un proceso dependiente de NF- κ B. La mayor capacidad que presenta la cepa parental para inducir estos efectos en comparación con el mutante de EftM podría estar asociada a su menor capacidad para activar NF- κ B. La

utilización de la vía de activación de NF- κ B como estrategia para debilitar la barrera epitelial podría ser un mecanismo universal puesto que son muchas las bacterias o componentes bacterianos que activan NF- κ B. Los estudios de Kobayashi y colaboradores están en la misma línea. Según estos autores, la activación de TLR-4 tanto por bacterias como *S. pneumoniae* o *H. influenzae*, como por sus componentes puros, ac. lipoteicoico y LPS, respectivamente, reduce la expresión de las claudinas 7 y 10, proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial. Esta reducción supone un aumento de la permeabilidad y un incremento en la trans migración bacteriana (Kobayashi et al., 2013). Este fenómeno requiere de la señalización celular a través de MAPK p38 y TGF- β . En contraste con otros mecanismos descritos para otros patógenos bacterianos, la estrategia para alterar la barrera epitelial que utilizan *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o el utilizado por *P. aeruginosa* descrito en esta tesis, no está basada en factores, mecanismos de virulencia o características específicas del patógeno, sino que reside en la activación de vías conservadas del sistema inmune innato y en consecuencia podrían representar una estrategia de trans migración utilizada por varias especies. Este hecho plantea la cuestión de por qué el huésped desearía abrir la barrera epitelial en respuesta a una infección bacteriana. En principio, dada la importancia de la activación de NF- κ B en la defensa innata, es posible que el incremento de la permeabilidad paracelular mediada por NF- κ B sea parte de la respuesta del huésped, permitiendo el flujo de células inmunitarias y factores antimicrobianos a lugar de la infección. La infección por *P. aeruginosa* causa un intenso flujo de neutrófilos al sitio de la infección y para que éstos alcancen su objetivo deben atravesar la barrera epitelial. Se ha observado que ha medida que el número de neutrófilos que cruzan la barrera epitelial aumenta, disminuye la integridad de ésta debido a un incremento en la apertura de los espacios paracelulares (Nash et al., 1987) demostrando que en condiciones inflamatorias la barrera epitelial puede ser laxa permitiendo el flujo de las células del sistema inmunitario. Esto sugiere que el incremento de la carga bacteriana supondrá una mayor estimulación del epitelio, aumentando la permeabilidad y en consecuencia permitiendo la llegada de un mayor número de células del sistema inmunitario. Desde este punto de vista, el aumento de la permeabilidad paracelular inducida por *P. aeruginosa* y mediada por la activación de NF- κ B debería verse como un mecanismo defensivo del huésped más que como un mecanismo de invasión del patógeno. Es probable que la mayor parte de las bacterias que atraviesan el epitelio sean eliminadas rápidamente por los componentes del sistema inmune presentes en la sangre, principalmente, complemento y neutrófilos. De esta forma, la capacidad invasora de *P. aeruginosa* residirá principalmente en la capacidad que tenga para evadir las defensas del huésped más que en la habilidad por transitar a través de la barrera epitelial. Esta observación es consistente con los resultados obtenidos en el modelo animal de infección de herida por quemadura. En estos experimentos el mutante deficiente en *eftM* fue marcadamente menos virulento que la cepa parental y fue completamente incapaz de diseminarse o sobrevivir en sangre. En nuestra opinión la diferencias observadas en el modelo animal entre la cepa parental y el mutante son difícilmente atribuibles por completo a las diferencias que hay en la capacidad de trans migración entre

Discusión

ambas cepas en el modelo de queratinocitos polarizados. Los resultados de nuestro grupo han demostrado que la mutación de *eftM* no reduce la resistencia de la cepa parental a la lisis por el complemento (Barbier et al., 2013), pero no hemos descartado la posibilidad de que la deficiencia de EftM altere la resistencia a otros mecanismos de defensa del huésped como la opsonofagocitosis. De cualquier manera, los resultados obtenidos *in vivo* demuestran que la mutación de la nueva metiltransferasa descubierta por nuestro grupo reduce de forma drástica la virulencia de *P. aeruginosa* en el modelo animal de infección por quemadura, lo que indica que podría tratarse de una nueva diana para el tratamiento de las infecciones de este importante patógeno humano.

7 Conclusiones

Conclusiones

1. El gen *eftM* codifica una nueva metiltransferasa, que hemos denominado EftM, que incorpora tres grupos metilo al residuo 5 de lisina del factor de elongación Tu, dando lugar a una estructura similar a la fosforilcolina.
2. EftM es necesario y suficiente para producir esta metilación tanto en *P. aeruginosa*, como en otros sistemas heterólogos, ubicándose en el citoplasma celular donde ejerce su función.
3. EftM está muy conservado dentro del género *Pseudomonas* y ampliamente distribuido, incluso, entre géneros diferentes.
4. Los estudios de fraccionamiento celular y de microscopía electrónica demuestran que la proteína EF-Tu se puede localizar en la membrana y presentar su extremo N-terminal orientado hacia el exterior celular.
5. La trimetilación de EF-Tu facilita a *P. aeruginosa* la invasión de queratinocitos cutáneos y la trans migración a través de ellos, mediante la interacción con PAFR.
6. *P. aeruginosa* reduce los niveles de la proteína ZO-1, constituyente de las uniones estrechas intercelulares, incrementando la permeabilidad paracelular de la barrera epitelial.
7. La alteración de la permeabilidad paracelular inducida por *P. aeruginosa* está mediada por la activación de NF- κ B.
8. La mutación de EftM reduce notablemente la capacidad de diseminación y la virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo murino de infección de herida por quemadura.

8 Apéndice

Apéndice

Tampón de carga: 10% glicerol, 62,25mM Tris HCl (pH 6,8), 5% β -mercaptoetanol, 2% dodecil sulfato sódico, 0,1% azul de bromofenol. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Tampón de lisis RIPA: Para su preparación se combinaron;
1ml VIAL 1: Tampón de lisis 1X
10 μ l VIAL 2: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo disuelto en dimetil sulfóxido
10 μ l VIAL 3: Cocktail inhibidor de proteasas disuelto en dimetil sulfóxido
10 μ l VIAL 4: Ortovanadato sódico disuelto en agua
Este tampón fue suministrado por Santa Cruz Biotechnology.

Solución zona resolución geles de poliacrilamida del 6 al 15%: Para la preparación de un gel se combinaron:

H₂O destilada: 2,6-1,1ml
10 % Dodecil sulfato sódico: 50 μ l
1,5 M Tris-HCl pH 8,8: 1,3ml
30 % Acrilamida-0,8% Bisacrilamida: 1-2,5 ml (dependiendo del porcentaje final de acrilamida (6-15%))
TEMED: 4-2 μ l
10 % Persulfato amónico: 50 μ l
Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Solución zona apilamiento geles de poliacrilamida al 5%: Para la preparación de un gel se combinaron:

H₂O destilada: 0,68ml
10% Dodecil sulfato sódico: 10 μ l
0,5M Tris-HCl pH 6,8: 0,13ml
30% Acrilamida-0,8% Bisacrilamida: 0,17ml
TEMED: 1 μ l
10% Persulfato amónico: 10 μ l
Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Tampón de electroforesis (pH 8,3): 1, 9M glicina, 0,25M Tris base, 35mM dodecil sulfato sódico. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Tampón de transferencia Towbin (pH 8,3): 25mM Tris base, 190mM glicina, 20% metanol. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Tampón fosfato salino (pH 7,2): 130mM NaCl, 5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄. pH 7,4.

Tampón de lisis: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol. pH 8,0.

Tampón de lavado: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazol. pH 8,0.

Tampón de elución: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM imidazol. pH 8,0.

Solución tinción de Coomassie: 45% metanol, 10% ácido acético, 0,12% Coomassie brilliant blue.

Solución de decoloración: 45% metanol, 10% ácido acético.

Tampón TB1 (pH 5,8): 1,2% RbCl, 1% MnCl₂·4H₂O, 3% (v/v) AcOK 1M (pH 7,5), 0,12% CaCl₂, 15% glicerol (v/v). Esterilizar por filtración.

Tampón TB2: 2% (v/v) 0,5M MOPS (pH 6,8), 0,12% RbCl, 0,83% CaCl₂, 15% glicerol (v/v). Estéril por filtración.

Tampón SMEB: 1mM HEPES (pH 7,0), 0,1mM MgCl₂, 300mM sacarosa.

Apéndice

Solución de recubrimiento: 6,3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 18mM HEPES, 122mM NaCl, 1,1mM D-(+)-Glucosa, Solución rojo fenol en DPBS al 0,125%, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de albúmina sérica bovina, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fibronectina y 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colágeno bovino tipo I.

9 Bibliografía

- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I., & Prince, A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 30(5), 627–634.
- Aijaz, S., Balda, M. S., & Matter, K. (2006). Tight junctions: molecular architecture and function. *International review of cytology*, 248, 261–298.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. L., & Girolomoni, G. (2005). Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 4(3), 329–334.
- Allison, J. S., Dawson, M., Drake, D., & Montie, T. C. (1985). Electrophoretic Separation and Molecular Weight Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* H-Antigen Flagellins. *Infection and immunity*, 49(3), 770–774.
- Ambler, R. P., & Rees, M. W. (1959). Epsilon-N-Methyl-lysine in bacterial flagellar protein. *Nature*, 184, 56–57.
- Ansermino, M., & Hemsley, C. (2004). Intensive care management and control of infection Intensive care management. *BMJ*, 329(July), 220–223.
- Aono, S., & Hirai, Y. (2008). Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Experimental cell research*, 314(18), 3326–3339.
- Azghani, A. O. (1996). *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 15(1), 132–140.
- Azghani, A. O., Gray, L. D., & Johnson, A. R. (1993). A bacterial protease perturbs the paracellular barrier function of transporting epithelial monolayers in culture. *Infection and immunity*, 61(6), 2681–2686.
- Azghani, A. O., Miller, E. J., & Peterson, B. T. (2000). Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung*, 178(5), 261–269.
- Balasubramanian, S., Kannan, T. R., & Baseman, J. B. (2008). The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin. *Infection and immunity*, 76(7), 3116–3123.
- Barbier, M., Oliver, A., Rao, J., Hanna, S. L., Goldberg, J. B., & Albertí, S. (2008). Novel phosphorylcholine-containing protein of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection isolates interacts with airway epithelial cells. *The Journal of infectious diseases*, 197(3), 465–473.
- Barbier, M. (2010). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections. *Doctoral thesis*.
- Barbier, M., Owings, J. P., Martínez-ramos, I., Damron, F. H., Gomila, R., & Blázquez, J. (2013). Lysine Trimethylation of EF-Tu Mimics Platelet-Activating Factor To Initiate *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *MBio*, 4(3), 1–8.
- Barel, M., Hovanessian, A. G., Meibom, K., Briand, J.-P., Dupuis, M., & Charbit, A. (2008). A novel receptor - ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. *BMC microbiology*, 8, 145.

Bibliografia

- Barrow, R. E., Jeschke, M. G., & Herndon, D. N. (2000). Early fluid resuscitation improves outcomes in severely burned children. *Resuscitation*, 45(2), 91–96.
- Battle, S. E., Meyer, F., Rello, J., Kung, V. L., & Hauser, A. R. (2008). Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *Journal of bacteriology*, 190(21), 7130–7140.
- Bbukowska, D., Serafińska, D., Rudowski, W., Hoffman, S., Olański, W., Gardzińska, E., ... Czarnańska, I. (1989). [Results of using polyvalent *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in children with burns by various medical centers]. *Polski tygodnik lekarski*, 44(43-45), 924–927.
- Bechah, Y., El Karkouri, K., Mediannikov, O., Leroy, Q., Pelletier, N., Robert, C., ... Raoult, D. (2010). Genomic, proteomic, and transcriptomic analysis of virulent and avirulent *Rickettsia prowazekii* reveals its adaptive mutation capabilities. *Genome research*, 20(5), 655–663.
- Belba, M. K., Petrela, E. Y., & Belba, A. G. (2013). Epidemiology of infections in a burn unit, Albania. *Burns*: journal of the International Society for Burn Injuries, 39(7), 1456–1467.
- Bhandary, S., Karki, P., & Sinha, B. K. (2002). Malignant otitis externa: a review. *Pacific health dialog*, 9(1), 64–67.
- Bielecki, P., Puchałka, J., Wos-Oxley, M. L., Loessner, H., Glik, J., Kawecki, M., ... dos Santos, V. a P. M. (2011). In-vivo expression profiling of *Pseudomonas aeruginosa* infections reveals niche-specific and strain-independent transcriptional programs. *PloS one*, 6(9), e24235.
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P. F., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International journal of medical microbiology*: IJMM, 300(8), 534–543.
- Boucher, J. C., Yu, H., Mudd, M. H., & Deretic, V. (1997). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: Characterization of muc mutations in clinical Isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infection and immunity*, 65(9), 3838–3846.
- Boukamp, P., Pstrussevskaja, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fuseing, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106, 761–771.
- Brandner, J. M. (2009). Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 72(2), 289–294.
- Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., & Kuhn, C. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *European journal of Cell Biology*, 81, 253–263.
- Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., ... Wozniak, D. J. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular microbiology*, 73(4), 622–638.
- Bystrova, O. V., Shashkov, A. S., Kocharova, N. A., Knirel, Y. A., Zähringer, U., & Pier, G. B. (2003). Elucidation of the structure of the lipopolysaccharide core and the linkage between the core and the O-antigen in *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 5 using strong alkaline degradation of the lipopolysaccharide. *Biochemistry. Biokhimiia*, 68(8), 918–925.

Bibliografía

- Caldas, T. D., El Yaagoubi, A., & Richarme, G. (1998). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *The Journal of biological chemistry*, 273(19), 11478–11482.
- Calderon, R. A., & Shennan, G. I. (1987). Production and immunological characterization of a monoclonal antibody to *Trichophyton quinckeanum*: interaction with phosphorylcholine-bearing components. *Journal of general microbiology*, 133(9), 2689–2698.
- Chen, M. L., Pothoulakis, C., & LaMont, J. T. (2002). Protein kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to *Clostridium difficile* toxin A. *The Journal of biological chemistry*, 277(6), 4247–4254.
- Chiang, Y. T., Shien, J. H., Tan, D. H., Shieh, M. K., Liu, C. C., Chen, Y. S., & Chang, P. C. (2013). Identification of the lic1ABCD operon that controls the phase-variable expression of phosphorylcholine on lipopolysaccharide from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian pathology*: journal of the W.V.P.A, 42(1), 72–8.
- Chitkara, Y. K., & Feierabend, T. C. (1981). Endogenous and exogenous infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a burns unit. *International surgery*, 66(3), 237–240.
- Clark, C. A., Thomas, L. K., & Azghani, A. O. (2011). Inhibition of protein kinase C attenuates *Pseudomonas aeruginosa* elastase-induced epithelial barrier disruption. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 45(6), 1263–1271.
- Clark, S. E., Snow, J., Li, J., Zola, T. a, & Weiser, J. N. (2012). Phosphorylcholine allows for evasion of bactericidal antibody by *Haemophilus influenzae*. *PLoS pathogens*, 8(3), e1002521.
- Cogen, A. L., Yamasaki, K., Muto, J., Sanchez, K. M., Crotty Alexander, L., Tanios, J., ... Gallo, R. L. (2010). *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A *Streptococcus*. *PLoS one*, 5(1), e8557.
- Cole, S. J., Records, A. R., Orr, M. W., Linden, S. B., & Lee, V. T. (2014). Catheter-associated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms. *Infection and immunity*, 82(5), 2048–2058.
- Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C. S., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C., ... Parsek, M. R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental microbiology*, 14(8), 1913–1928.
- Cruz, J. W., Rothenbacher, F. P., Maehigashi, T., Lane, W. S., Dunham, C. M., & Woychik, N. A. (2014). Doc toxin is a kinase that inactivates elongation factor Tu. *The Journal of biological chemistry*, 289(11), 7788–7798.
- Cryz, S. J., Furer, E., & Germanier, R. (1984). Protection Against Fatal *Pseudomonas aeruginosa* Burn Wound Sepsis by Immunization with Lipopolysaccharide and High-. *Infection and immunity*, 43(3), 795–799.
- Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., & Tuomanen, E. I. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 377(6548), 435–438.
- D'Avignon, L. C., Hogan, B. K., Murray, C. K., Loo, F. L., Hospenthal, D. R., Cancio, L. C., ... Wolf, S. E. (2010). Contribution of bacterial and viral infections to attributable mortality in patients with severe burns: an autopsy series. *Burns*: journal of the International Society for Burn Injuries, 36(6), 773–779.

Bibliografia

- Dai, T., Gupta, A., Huang, Y.-Y., Yin, R., Murray, C. K., Vrahas, M. S., ... Hamblin, M. R. (2013). Blue light rescues mice from potentially fatal *Pseudomonas aeruginosa* burn infection: efficacy, safety, and mechanism of action. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(3), 1238–1245.
- Dallo, S. F., Kannan, T. R., Blaylock, M. W., & Baseman, J. B. (2002). Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 46(4), 1041–1051.
- Dallo, S. F., Zhang, B., Denno, J., Hong, S., Tsai, A., Haskins, W., ... Weitao, T. (2012). Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 128705.
- Davies, D. G., Chakrabarty, A. M., & Geesey, G. G. (1993). Exopolysaccharide Production in Biofilms: Substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1181–1186.
- De Bentzmann, S., Polette, M., Zahm, J. M., Hinnrasky, J., Kileztky, C., Bajolet, O., ... Puchelle, E. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(2), 209–219.
- De Simone, V., Franzè, E., Ronchetti, G., Colantoni, A., Fantini, M. C., Di Fusco, D., ... Stolfi, C. (2014). Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, 1(9), 1-11
- Deitch, E. A., Landry, K. N., & McDonald, J. C. (1985). Postburn Impaired Cell-mediated Immunity May Not Be Due to Lazy Lymphocytes But to Overwork. *Ann. Surg.*, 201(6), 793–802.
- Demange, P., Bateman, A., Mertz, C., Dell, A., Piémont, Y., & Abdallah, M. A. (1990). Bacterial siderophores: structures of pyoverdins Pt, siderophores of *Pseudomonas tolaasii* NCPPB 2192, and pyoverdins Pf, siderophores of *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798. Identification of an unusual natural amino acid. *Biochemistry*, 29(50), 11041–11051.
- Dermal, C. D., Cells, D., Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., ... Ueno, H. (2008). Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells. *Immunity*, 29(3), 497–510.
- Diebel, L. N., Liberati, D. M., Amin, P. B., & Diglio, C. A. (2009). Cleavage of SIgA by gram negative respiratory pathogens enhance neutrophil inflammatory potential. *The Journal of trauma*, 66(5), 1336–1342.
- Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V, Winokur, P. L., Gales, A. C., ... Beach, M. (1999). Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 29(3), 595–607.
- Drake, D., & Montie, T. C. (1988). Flagella , motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*, 134, 43–52.
- Drake, D. R., Brogden, K. a, Dawson, D. V, & Wertz, P. W. (2008). Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *Journal of lipid research*, 49(1), 4–11.

Bibliografía

- Eum, S. Y., Jaraki, D., Bertrand, L., Andrés, I. E., & Toborek, M. (2014). Disruption of epithelial barrier by quorum-sensing N-3-(oxododecanoyl)-homoserine lactone is mediated by matrix metalloproteinases. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 306(11), G992–G1001.
- Eutamene, H., Theodorou, V., Schmidlin, F., Tondereau, V., Garcia-Villar, R., Salvador-Cartier, C., ... Bueno, L. (2005). LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK. *The European respiratory journal*, 25(5), 789–796.
- Evans, D. A., & Fiedler, M. A. (1996). Lung abscess in a patient with cystic fibrosis: case report and review of the literature. *Pediatric pulmonology*, 21(5), 337–340.
- Fadeyibi, I. O., Raji, M. A., Ibrahim, N. A., Ugburo, A. O., & Ademiluyi, S. (2013). Bacteriology of infected burn wounds in the burn wards of a teaching hospital in Southwest Nigeria. *Burns*: journal of the International Society for Burn Injuries, 39(1), 168–173.
- Faezi, S., Safarloo, M., Amirmozafari, N., Nikokar, I., Siadat, S. D., Holder, I. A., & Mahdavi, M. (2014). Protective efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* type-A flagellin in the murine burn wound model of infection. *APMIS*: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 122(2), 115–127.
- Fajardo, A., Martínez-Martín, N., Mercadillo, M., Galán, J. C., Ghysels, B., Matthijs, S., ... Martínez, J. L. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS one*, 3(2), e1619.
- Fasano, A., & Nataro, J. P. (2004). Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. *Advanced drug delivery reviews*, 56(6), 795–807.
- Felts, A. G., Giridhar, G., Grainger, D. W., & Slunt, J. B. (1999). Efficacy of locally delivered polyclonal immunoglobulin against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a murine burn wound model. *Burns*: journal of the International Society for Burn Injuries, 25(5), 415–423.
- Ferguson, E. H., & Rothman, S. (1956). Fungus infections of the skin. *Pediatric clinics of North America*, 555–595.
- Filer, D., & Furano, A. V. (1980). Portions of the gene encoding elongation factor Tu are highly conserved in prokaryotes. *The Journal of biological chemistry*, 255(2), 728–734.
- Fischer, C. L., Walters, K. S., Drake, D. R., Dawson, D. V., Blanchette, D. R., Brogden, K. a, & Wertz, P. W. (2013). Oral mucosal lipids are antibacterial against *Porphyromonas gingivalis*, induce ultrastructural damage, and alter bacterial lipid and protein compositions. *International journal of oral science*, 5(3), 130–140.
- Fitzwater, J., Purdue, G. F., Hunt, J. L., & O'Keefe, G. E. (2003). The risk factors and time course of sepsis and organ dysfunction after burn trauma. *The Journal of trauma*, 54(5), 959–966.
- Fogle, M. R., Griswold, J. a., Oliver, J. W., & Hamood, A. N. (2002). Anti-ETA IgG neutralizes the effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Journal of Surgical Research*, 106(1), 86–98.
- Franklin, M. J., Chetan, E., Gacesa, P., & Sonesson, A. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-Mannuronan epimerase. *Journal of bacteriology*, 176(7), 1821–1830.

Bibliografía

- Garmendia, J., Phillips, A. D., Carlier, M.-F., Chong, Y., Schüller, S., Marches, O., ... Frankel, G. (2004). TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cellular microbiology*, 6(12), 1167–1183.
- Geyik, M. F., Aldemir, M., Hosoglu, S., & Tacyildiz, H. I. (2003). Epidemiology of burn unit infections in children. *American journal of infection control*, 31(6), 342–346.
- Goldberg, J. B., Coyne, M. J., & Neely, A. N. (1995). Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa* algC Mutant in a Burned-Mouse Model of Infection. *Infection and immunity*, 63(10), 4166–4169.
- Golovkine, G., Faudry, E., Bouillot, S., Voulhoux, R., Attrée, I., & Huber, P. (2014). VE-cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates type III secretion system toxicity in endothelial cells. *PLoS pathogens*, 10(3), e1003939.
- Govan, J. R. W., & Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews*, 60(3), 539–574.
- Granato, D., Bergonzelli, G. E., Pridmore, R. D., Marvin, L., Rouvet, M., & Corthésy-Theulaz, I. E. (2004). Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and immunity*, 72(4), 2160–2169.
- Grant, S. G. N., Jesseet, J., Bloomt, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 4645–4649.
- Greene, S. L., Su, W. P., & Muller, S. A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* infections of the skin. *American family physician*, 29(1), 193–200.
- Gruenheid, S., & Finlay, B. B. (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, 422(6933), 775–781.
- Guggenheim, M., Zbinden, R., Handschin, A. E., Gohritz, A., Altintas, M. a, & Giovanoli, P. (2009). Changes in bacterial isolates from burn wounds and their antibiograms: a 20-year study (1986-2005). *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 35(4), 553–560.
- Hammond, A. a, Miller, K. G., Kruczek, C. J., Dertien, J., Colmer-Hamood, J. a, Griswold, J. a, ... Hamood, A. N. (2011). An *in vitro* biofilm model to examine the effect of antibiotic ointments on biofilms produced by burn wound bacterial isolates. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 37(2), 312–321.
- Hamrahi, V., Hamblin, M. R., Jung, W., Benjamin, J. B., Paul, K. W., Fischman, A. J., ... Carter, E. a. (2012). Gram-negative bacterial infection in thigh abscess can migrate to distant burn depending on burn depth. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012, 1–6.
- Hauser, A. R. (2009). The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. *Nat Rev Microbiol*, 7(9), 654–665.
- Hegge, F. T., Hitchen, P. G., Aas, F. E., Kristiansen, H., Løvold, C., Egge-Jacobsen, W., ... Koomey, M. (2004). Unique modifications with phosphocholine and phosphoethanolamine define alternate antigenic forms of *Neisseria gonorrhoeae* type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10798–10803.

Bibliografía

- Henderson, B., & Martin, A. (2013). Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence. *Current topics in microbiology and immunology*, 358, 155–213.
- Hill, A. T., Campbell, E. J., Hill, S. L., Bayley, D. L., & Stockley, R. A. (2000). Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *The American journal of medicine*, 109(4), 288–295.
- Holt, J. G., Krieg, N. E., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.
- Jabalameli, F., Mirsalehian, A., Khoramian, B., Aligholi, M., Khoramrooz, S. S., Asadollahi, P., ... Emaneini, M. (2012). Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 38(8), 1192–1197.
- Jacquot, J., Tournier, J., & Puchelle, E. (1985). *In vitro* evidence that human airway lysozyme is cleaved and inactivated by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and not by human leukocyte elastase. *Infection and immunity*, 47(2), 555–560.
- Jen, F. E.-C., Jones, C. E., Wilson, J. C., Schulz, B. L., & Jennings, M. P. (2013). Substrate recognition of a structure motif for phosphorylcholine post-translational modification in *Neisseria meningitidis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 431(4), 808–814.
- Jeyapaul, J., Mehta, L. N., Arora, S., & Antia, N. H. (1984). Fc and complement receptor integrity of polymorphonuclear (PMN) cells following thermal injury. *Burns, including thermal injury*, 10(6), 387–395.
- Kalkan, G., Duygu, F., & Bas, Y. (2013). Greenish-blue staining of underclothing due to *Pseudomonas aeruginosa* infection of intertriginous dermatitis. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(9), 1192–1194.
- Kaushal, N., Naz, S., & Tiwary, A. (2011). Angelica archangelica extract induced perturbation of rat skin and tight junctional protein (ZO-1) of HaCaT cells. *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 19(1), 1–11.
- Keen, E. F., Robinson, B. J., Hospenthal, D. R., Aldous, W. K., Wolf, S. E., Chung, K. K., & Murray, C. K. (2010). Incidence and bacteriology of burn infections at a military burn center. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 36(4), 461–468.
- Kehry, M. R., & Dahlquist, F. W. (1982). The methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli*. Identification of the multiple methylation sites on methyl-accepting chemotaxis protein I. *The Journal of biological chemistry*, 257(17), 10378–10386.
- Kharazmi, A. (1991). Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunology letters*, 30(2), 201–205.
- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., & Kuwano, K. (2008). A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cellular microbiology*, 10(7), 1491–1504.
- Kim, D. K., Kim, J. J., Kim, J. H., Woo, Y. M., Kim, S., Yoon, D. W., ... Woo, S. (2000). Comparison of two immunization schedules for a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins vaccine in burn patients. *Vaccine*, 19, 1274–1283.

Bibliografia

- Kishioka, C., Okamoto, K., & Hassett, D. J. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Is a Potent Secretagogue in the Isolated Ferret Trachea. *Pediatric pulmonology*, 27(3), 174–179.
- Klotzt, M. G., & Hutcheson, S. W. (1992). Multiple Periplasmic Catalases in Phytopathogenic Strains of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2468–2473.
- Knezevic, I. I., Predescu, S. A., Neamu, R. F., Gorovoy, M. S., Knezevic, N. M., Easington, C., ... Predescu, D. N. (2009). Tiam1 and Rac1 are required for platelet-activating factor-induced endothelial junctional disassembly and increase in vascular permeability. *The Journal of biological chemistry*, 284(8), 5381–5394.
- Kobayashi, K., Oyama, S., Numata, A., Rahman, M. M., & Kumura, H. (2013). Lipopolysaccharide disrupts the milk-blood barrier by modulating claudins in mammary alveolar tight junctions. *PLoS one*, 8(4), e62187.
- Kolberg, J., Høiby, E. A., & Jantzen, E. (1997). Detection of the phosphorylcholine epitope in *Streptococci*, *Haemophilus* and pathogenic *Neisseriae* by immunoblotting. *Microbial pathogenesis*, 22(6), 321–329.
- Kolter, R., Siegele, D. A., & Tormo, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual review of microbiology*, 47, 855–874.
- Kraal, B., Lippmann, C., & Kleanthous, C. (1999). Translational regulation by modifications of the elongation factor Tu. *Folia microbiologica*, 44(2), 131–141.
- Kulasekara, B. R., Kulasekara, H. D., Wolfgang, M. C., Stevens, L., Frank, D. W., & Lory, S. (2006). Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 188(11), 4037–4050.
- Kunert, A., Losse, J., Gruszyn, C., Hühn, M., Kaendler, K., Mikkat, S., ... Zipfel, P. F. (2007). Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(5), 2979–2988.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *The Plant cell*, 16(12), 3496–3507.
- L'Italien, J. J., & Laursen, R. A. (1979). Location of the site of methylation in elongation factor Tu. *FEBS letters*, 107(2), 359–362.
- Lakkis, C. (2001). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Hydrogel Contact Lens Disinfection Correlates with Cytotoxic Activity. *Journal of clinical microbiology*, 39(4), 1477–1486.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 7072–7077.
- Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., & Brandner, J. M. (2002). Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *European journal of Cell Biology*, 81, 419–435.

Bibliografia

- Laughlin, R. S., Musch, M. W., Hollbrook, C. J., Rocha, F. M., Chang, E. B., & Alverdy, J. C. (2000). The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. *Annals of surgery*, 232(1), 133–142.
- Lee, A., Chow, D., Haus, B., Tseng, W., Evans, D., Fleiszig, S., ... Machen, T. (1999). Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *The American journal of physiology*, 277(1 Pt 1), L204–L217.
- Létoffé, S., Redeker, V., & Wandersman, C. (1998). Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Molecular microbiology*, 28(6), 1223–1234.
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., ... Ausubel, F. M. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2833–2838.
- Linker, A., & Jones, R. S. (1966). A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, 241, 3845–3851.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2002). Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 194–222.
- Lynch, J. P. (2001). Hospital-acquired pneumonia risk factors , Microbiology , and Treatment. *chest journal*, 119(2), 373S–384S.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., & Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS pathogens*, 5(3), e1000354.
- Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of bacteriology*, 188(23), 8213–8221.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J. C., Ramseier, T. M., & Saier, M. H. (2003). Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1611(1-2), 223–233.
- Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., & O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426(6964), 306–310.
- Maharaj, R., May, T. B., Wang, S. K., & Chakrabarty, A. M. (1993). Sequence of the alg8 and alg44 genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 136(1-2), 267–269.
- Mahenthalingam, E., Campbell, M. E., & Speert, D. P. (1994). Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infection and immunity*, 62(2), 596–605.
- Manafi, A., Kohanteb, J., Mehrabani, D., Japoni, A., Amini, M., Naghmachi, M., ... Khalili, N. (2009). Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model. *BMC microbiology*, 9, 23.

Bibliografia

- Mariencheck, W. I., Alcorn, J. F., Palmer, S. M., & Wright, J. R. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 28(4), 528–537.
- Marques, M. A., Chitale, S., Brennan, P. J., & Pessolani, M. C. (1998). Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infection and immunity*, 66(6), 2625–2631.
- Martin, D. W., Holloway, B. W., & Deretic, V. (1993). Characterization of a Locus Determining the Mucoid Status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU Shows Sequence Similarities with a Bacillus Sigma Factor. *Journal of bacteriology*, 175(4), 1153–1164.
- Matar, G. M., Ramlawi, F., Hijazi, N., Khneisser, I., & Abdelnoor, A. M. (2002). Transcription levels of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a gene and severity of symptoms in patients with otitis externa. *Current microbiology*, 45(5), 350–354.
- Matsumoto, K. (2004). Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biological chemistry*, 385(11), 1007–1016.
- Meyle, J., Gültig, K., Rascher, G., & Wolburg, H. (1999). Transepithelial electrical resistance and tight junctions of human gingival keratinocytes. *Journal of periodontal research*, 34(4), 214–222.
- Miller, L. S., & Modlin, R. L. (2007). Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *The Journal of investigative dermatology*, 127(2), 262–263.
- Mishra, M., Byrd, M. S., Sergeant, S., Azad, A. K., Parsek, M. R., McPhail, L., ... Wozniak, D. J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cellular microbiology*, 14(1), 95–106.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, A., ... Mekalanos, J. J. (2006). A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 312(5779), 1526–1530.
- Mousa, H. A. (1997). Aerobic, anaerobic and fungal burn wound infections. *The Journal of hospital infection*, 37(4), 317–323.
- Muller, M., Li, Z., & Maitz, P. K. M. (2009). *Pseudomonas* pyocyanin inhibits wound repair by inducing premature cellular senescence: role for p38 mitogen-activated protein kinase. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 35(4), 500–508.
- Murakami, M., Ohtake, T., Dorschner, R. A., Schitteck, B., Garbe, C., Gallo, R. L., ... Diego, S. (2002). Cathelicidin Anti-Microbial Peptide Expression in Sweat, an Innate Defense System for the Skin. *J invest dermatol*, 119(5), 1090–1095.
- Mutharia, L. M., & Hancock, R. E. W. (1983). Surface localization of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, 42(3), 1027–1033.
- Muza-Moons, M. M., Koutsouris, A., & Hecht, G. (2003). Disruption of cell polarity by enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. *Infection and immunity*, 71(12), 7069–7078.

Bibliografia

- Muza-Moons, M. M., Schneeberger, E. E., & Hecht, G. A. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cellular microbiology*, 6(8), 783–793.
- Nash, S., Stafford, J., & Madara, J. L. (1987). Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *The Journal of clinical investigation*, 80(4), 1104–1113.
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., & Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 9(10), 679–691.
- Nichols, D. P., Caceres, S., Caverly, L., Fratelli, C., Kim, S. H., Malcolm, K., ... Nick, J. a. (2013). Effects of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. *The Journal of surgical research*, 183(2), 767–776.
- Nickoloff, B. J., & Turka, L. A. (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunology today*, 15(10), 464–469.
- Nomura, K., Obata, K., Keira, T., Miyata, R., Hirakawa, S., Takano, K., ... Kojima, T. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respiratory research*, 15, 21.
- Nusrat, A., von Eichel-Streiber, C., Turner, J. R., Verkade, P., Madara, J. L., & Parkos, C. A. (2001). *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infection and immunity*, 69(3), 1329–1336.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30, 295–304.
- Ochi, H., Ohtsuka, H., Yokota, S., Uezumi, I., Terashima, M., Irie, K., & Noguchi, H. (1991). Inhibitory activity on bacterial motility and *in vivo* protective activity of human monoclonal antibodies against flagella of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 59(2), 550–554.
- Ohnemus, U., Kohrmeyer, K., Houdek, P., Rohde, H., Wladykowski, E., Vidal, S., ... Brandner, J. M. (2008). Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative *Staphylococcus* strains. *The Journal of investigative dermatology*, 128(4), 906–916.
- Ohno, N., Asada, N., Adachi, Y., & Yadomae, T. (1995). Enhancement of LPS triggered TNF-alpha (tumor necrosis factor-alpha) production by (1-->3)-beta-D-glucans in mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 18(1), 126–133.
- Okuda, J., Hayashi, N., Okamoto, M., Sawada, S., Minagawa, S., Yano, Y., & Gotoh, N. (2010). Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the intestinal tract is mediated by the binding of ExoS to an Na,K-ATPase regulator, FXYD3. *Infection and immunity*, 78(11), 4511–4522.
- Park, P. W., Pier, G. ., Preston, M., Goldberger, O., Fitzgerald, M., & M., B. (2000). Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3057–3064.
- Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R., & Zhou, W. (1990). Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 58(9), 3009–3014.

Bibliografia

- Pedersen, S. S., Espersen, F., Hiby, N., & Jensen, T. I. M. (1990). Immunoglobulin A and Immunoglobulin G antibody responses alginates from *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*, 28(4), 747–755.
- Pethe, K., Bifani, P., Drobecq, H., Sergheraert, C., Debrie, A.-S., Locht, C., & Menozzi, F. D. (2002). Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10759–10764.
- Pier, G B, Coleman, F., Grout, M., Franklin, M., & Ohman, D. E. (2001). Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infection and immunity*, 69(3), 1895–901.
- Pier, G B, Pollack, M., & Cohen, M. (1984). Immunochemical characterization of high-molecular-weight polysaccharide from Fisher immunotype 3 *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 45(2), 309–313.
- Pier, Gerald B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol*, 297(5), 277–295.
- Qiu, Y., Xi, J., Du, L., Roje, S., & Poovaiah, B. W. (2012). A dual regulatory role of *Arabidopsis* calreticulin-2 in plant innate immunity. *The Plant journal*: for cell and molecular biology, 69(3), 489–500.
- Quénée, L., Lamotte, D., & Polack, B. (2005). Combined sacB -based negative selection and cre - lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques*, 38(1), 63–67.
- Ramiah, K., van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. T. (2008). Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Research in microbiology*, 159(6), 470–475.
- Rampioni, G., Schuster, M., Greenberg, E. P., Zennaro, E., & Leoni, L. (2009). Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *FEMS microbiology letters*, 301(2), 210–217.
- Ramsey, D. M., & Wozniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular microbiology*, 56(2), 309–322.
- Ranjbar, R., Owlia, P., Sadari, H., & Mansouri, S. (2011). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burned Patients Hospitalized in a Major Burn Center in Tehran , Iran. *Acta Med Iran*, 49(10), 675–679.
- Rau, M. H., Marvig, R. L., Ehrlich, G. D., Molin, S., & Jelsbak, L. (2012). Deletion and acquisition of genomic content during early stage adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to a human host environment. *Environmental microbiology*, 14(8), 2200–2211.
- Rello, J., Bodi, M., & Santamaria, J. M. (2003). Incidence , Etiology , and Outcome of Nosocomial Pneumonia in ICU Patients Requiring Percutaneous Tracheotomy for Mechanical Ventilation *. *chest journal*, 124(6), 2239–2243.
- Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J., & Cornelis, P. (2010). Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 9), 2597–2607.

Bibliografia

- Rezaei, E., Safari, H., Naderinasab, M., & Aliakbarian, H. (2011). Common pathogens in burn wound and changes in their drug sensitivity. *Burns*: *journal of the International Society for Burn Injuries*, 37(5), 805–807.
- Roy, H., Becker, H. D., Mazauric, M.-H., & Kern, D. (2007). Structural elements defining elongation factor Tu mediated suppression of codon ambiguity. *Nucleic acids research*, 35(10), 3420–3430.
- Rumbaugh, K P, Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (1999). Contribution of the regulatory gene lasR to the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infection of burned mice. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 20(1), 42–49.
- Rumbaugh, Kendra P, Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (2000). The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection*, 2, 1721–1731.
- Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), 1–25.
- Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Inazawa, J., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1997). Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *European journal of cell biology*, 73(3), 222–231.
- Sajid, A., Arora, G., Gupta, M., Singhal, A., Chakraborty, K., Nandicoori, V. K., & Singh, Y. (2011). Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* elongation factor Tu with GTP is regulated by phosphorylation. *Journal of bacteriology*, 193(19), 5347–5358.
- Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., & Namba, K. (2001). Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 410(6826), 331–337.
- Sambrook, J., & Gething, M. J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*, 342(6247), 224–225.
- Sangeorzan, J. A., Bradley, S. F., & Kauffman, C. A. (1990). Cutaneous manifestations of *Pseudomonas* infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of dermatology*, 126(6), 832–833.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, 184(4), 1140–1154.
- Schalk, I. J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Re, A., Brant, A., ... Yvette, F.-G. (2001). Iron-free pyoverdinin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Molecular Microbiology*, 39(2), 351–360.
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(6), 1213–1228.
- Schultz, D. R., & Miller, K. D. (1974). Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: Inactivation of Complement Components and Complement-Derived Chemotactic and Phagocytic Factors. *Infection and immunity*, 10(1), 128–135.
- Schwarzer, C., Fu, Z., Fischer, H., & Machen, T. E. (2008). Redox-independent activation of NF-kappaB by *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin in a cystic fibrosis airway epithelial cell line. *The Journal of biological chemistry*, 283(40), 27144–27153.

Bibliografia

- Schweda, E. K., Brisson, J. R., Alvelius, G., Martin, A., Weiser, J. N., Hood, D. W., ... Richards, J. C. (2000). Characterization of the phosphocholine-substituted oligosaccharide in lipopolysaccharides of type b *Haemophilus influenzae*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(12), 3902–3913.
- Schweizer, H. P. (1991). *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene*, 97(1), 109–121.
- Silvestre, J. F., & Betlloch, M. I. (1999). Cutaneous manifestations due to *Pseudomonas* infection. *International journal of dermatology*, 38(6), 419–431.
- Simonovic, I., Rosenberg, J., Koutsouris, A., & Hecht, G. (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cellular microbiology*, 2(4), 305–315.
- Skerman, V., McGowan, V., & Sneath, P. (1989). P. ASM Press.
- Sokol, P. A., & Tn, C. (1987). Surface Expression of Ferripyochelin-Binding Protein Is Required for Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 55(9), 2021–2025.
- Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y., & Tsukita, S. (1999). *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *The Journal of cell biology*, 147(1), 195–204.
- Soong, G., Parker, D., Magargee, M., & Prince, A. S. (2008). The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. *Journal of bacteriology*, 190(8), 2814–2821.
- Stanley, P. M. (1983). Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Canadian journal of microbiology*, 29(11), 1493–1499.
- Stoitzner, P., Pfaller, K., Sto, H., & Romani, N. (2002). A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J invest dermatol*, 118(1), 117–125.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964.
- Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K.-I., Tajima, A., Iwase, T., & Mizunoe, Y. (2013). *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *Journal of bacteriology*, 195(8), 1645–1655.
- Taneja, N., Chari, P. S., Singh, M., Singh, G., Biswal, M., & Sharma, M. (2013). Evolution of bacterial flora in burn wounds: key role of environmental disinfection in control of infection. *Int J Burn Trauma*, 3(2), 102–107.
- Tebbe, B., Mankertz, J., Schwarz, C., Amasheh, S., Fromm, M., Assaf, C., ... Orfanos, C. E. (2002). Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes. *Archives of dermatological research*, 294(1-2), 14–18.
- Teng, F., Murray, B. E., & Weinstock, G. M. (1998). Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to enterococci: a method to make insertion mutations. *Plasmid*, 39(3), 182–186.

Bibliografia

- Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2014). Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- κ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 β -exposed Caco-2 cells. *The British journal of nutrition*, 111(3), 415–423.
- Tsukamoto, T., & Nigam, S. K. (1997). Tight Junction Proteins Form Large Complexes and Associate with the Cytoskeleton in an ATP Depletion Model for Reversible Junction Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16133–16139.
- Uchida, Y., Behne, M., Quiec, D., Elias, P. M., & Holleran, W. M. (2001). Vitamin C Stimulates Sphingolipid Production and Markers of Barrier Formation in Submerged Human Keratinocyte Cultures. *J invest dermatol*, 117(5), 1307–1313.
- Vallet, I., Diggle, S. P., Stacey, R. E., Ca, M., Ventre, I., Lory, S., ... Filloux, A. (2004). Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*: Fimbrial cup Gene Clusters Are Controlled by the Transcriptional Regulator MvaT †. *Journal of bacteriology*, 186(9), 2880–2890.
- Vikström, E., Bui, L., Konradsson, P., & Magnusson, K.-E. (2010). Role of calcium signalling and phosphorylations in disruption of the epithelial junctions by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule. *European journal of cell biology*, 89(8), 584–597.
- Vikström, E., Tafazoli, F., & Magnusson, K.-E. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-l-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS letters*, 580(30), 6921–6928.
- Vincent, J.-L., & Jacobs, F. (2003). Infection in critically ill patients: clinical impact and management. *Current opinion in infectious diseases*, 16(4), 309–313.
- Vollmer, W., & Tomasz, A. (2001). Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 39(6), 1610–1622.
- Waite, R. D., Papakonstantinou, A., Littler, E., & Curtis, M. A. (2005). Transcriptome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Growth □: Comparison of Gene Expression in Planktonic Cultures and Developing and Mature Biofilms †. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6571–6576.
- Walker, D., Sun, T., MacNeil, S., & Smallwood, R. (2006). Modeling the effect of exogenous calcium on keratinocyte and HaCat cell proliferation and differentiation using an agent-based computational paradigm. *Tissue engineering*, 12(8), 2301–2309.
- Wallace, C. J., Medina, S. H., & ElSayed, M. E. H. (2014). Effect of rhamnolipids on permeability across Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical research*, 31(4), 887–894.
- Walsh, A. G., Matewish, M. J., Burrows, L. L., Monteiro, M. A., Perry, M. B., & Lam, J. S. (2000). Lipopolysaccharide core phosphates are required for viability and intrinsic drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 35(4), 718–727.
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual review of microbiology*, 58, 611–647.
- Wang, C., Ye, F., Kumar, V., Gao, Y.-G., & Zhang, L.-H. (2014). BswR controls bacterial motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through modulation of the small RNA rsmZ. *Nucleic acids research*, 42(7), 4563–4576.
- Warren, M. J., & Jennings, M. P. (2003). Identification and characterization of *pptA*: a gene involved in the phase-variable expression of phosphorylcholine on pili of *Neisseria meningitidis*. *Infection and immunity*, 71(12), 6892–6898.

Bibliografía

- Weber, J., & McManus, A. (2004). Infection control in burn patients. *Burns*: journal of the International Society for Burn Injuries, 30(8), A16–24.
- West, T. P. (2010). Control of pyrimidine nucleotide formation in *Pseudomonas fulva*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97(3), 307–11.
- Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., & Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858), 860–864.
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., & Jaeger, K.-E. (2007). The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 189(18), 6695–6703.
- Winsor, G. L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., ... Brinkman, F. S. L. (2011). *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D596–600.
- Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., ... Lory, S. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*, 100(14), 8484–8489.
- Xolalpa, W., Vallecillo, A. J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R., ... Espitia, C. (2007). Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*, 7(18), 3332–3341.
- Yang, L., Hu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Ulstrup, J., & Molin, S. (2011). Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental microbiology*, 13(7), 1705–1717.
- Yeung, C. K., & Lee, K. H. (1998). Community acquired fulminant *Pseudomonas* infection of the gastrointestinal tract in previously healthy infants. *Journal of paediatrics and child health*, 34(6), 584–587.
- Yi, X., Wang, Y., & Yu, F. S. (2000). Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(13), 4093–4100.
- Zachariah, P., & Liston, J. (1973). Temperature adaptability of psychrotrophic *Pseudomonas*. *Applied microbiology*, 26(3), 437–438.
- Zhang, J. R., Idanpaan-Heikkila, I., Fischer, W., & Tuomanen, E. I. (1999). Pneumococcal licD2 gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Molecular microbiology*, 31(5), 1477–1488.
- Zhang, S., McCormack, F. X., Levesque, R. C., O'Toole, G. a., & Lau, G. W. (2007). The flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A. *PLoS one*, 2(6), e564.
- Zhang, Y., Deng, S., & Liu, J. (2005). Analysis of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a burn ward to antibiotics *in vitro*. *Zhonghua shao shang za zhi = Zhonghua shaoshang zazhi = Chinese journal of burns*, 21(2), 104–106.
- Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S., & Meda, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 74(6), 3134–3147.

